



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**Α' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΩΓΡΑΦΟΣ**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΛΕΜΦΑΔΕΝΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΕΩΝΙΔΑ ΑΛΕΒΙΖΟΥ

ΓΕΝΙΚΟΥ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2013

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**Α' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΩΓΡΑΦΟΣ**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΛΕΜΦΑΔΕΝΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΛΕΩΝΙΑ ΑΛΕΒΙΖΟΥ
ΓΕΝΙΚΟΥ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥ**

ΑΘΗΝΑ 2013

ΕΚ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΥ ΟΡΚΟΥ

Ὁμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἄσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἑμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωύτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἰοῖσί τε ἑμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμῆ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἶρξῃν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ ἀίτηθεις θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαίων καὶ ἀνδράων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ ὃ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρήτα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὁρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιørκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Στους γονείς μου, γιατί σε αυτούς οφείλω τα πάντα.

.

Στον αείμνηστο Αναπληρωτή Καθηγητή Στέφανο Παπαδόπουλο.

ΜΕ ΕΥΓΝΩΜΟΣΥΝΗ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Χειρουργικής κ. **Γεώργιο Ζωγράφο**, Διευθυντή της Α' Προπαιδευτικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών που στεγάζεται στο Π.Γ.Ν.Α «Ιπποκράτειο», που απλόχερα μου διέθεσε το αρχείο των ασθενών του, για τις εύστοχες παρατηρήσεις του αλλά και την συμπαράσταση του κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης του πειραματικού πρωτοκόλλου.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής κ. **Μανούσο Κωνσταντουλάκη**, υπεύθυνο του εργαστηρίου Χειρουργικής Έρευνας του Πανεπιστημίου Αθηνών που στεγάζεται στο Π.Γ.Ν.Α «Ιπποκράτειο», επιβλέπον μέλος της διδακτορικής μου διατριβής, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργασθώ υπό την επίβλεψή του στο παρόν ερευνητικό πρωτόκολλο και την καθοδήγηση του μέχρι την ολοκλήρωση του.

Τις Βιολόγους του Εργαστηρίου Χειρουργικής Έρευνας του Πανεπιστημίου Αθηνών κκ. **Αγάπη Κατάκη** και **Αναστασία Δερβεντζή** για την απρόσκοπτη φιλοξενία, την καθοδήγηση, την ηθική συμπαράσταση και την ενεργό συμμετοχή τους.

Τον Καθηγητή Χειρουργικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ **Ανδρέα Μανουρά** για την καθοριστική συνεισφορά του στην επιτυχή εκτέλεση του πειραματικού πρωτοκόλλου.

Τον αείμνηστο Αναπληρωτή Καθηγητή **Στέφανο Παπαδόπουλο** που με τις συμβουλές του και τις παρεμβάσεις του συνέβαλε καθοριστικά στην πρόοδο της διδακτορικής διατριβής.

Ημερομηνία υποβολής αιτήσεως Υποψηφίου Διδάκτορα: 1-12-2003

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής: 11-12-2003

Ημερομηνία καθορισμού του Θέματος: 14-5-2004

Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής: 10-12-2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΩΓΡΑΦΟΣ

Καθηγητής Χειρουργικής

ΑΝΔΡΕΑΣ ΜΑΝΟΥΡΑΣ*

Καθηγητής Χειρουργικής

ΜΑΝΟΥΣΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΥΛΑΚΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής.

Επιβλέπον Μέλος.

* Σε αντικατάσταση του αείμνηστου Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής Στέφανου Παπαδόπουλου. (Αριθμ. Πρωτ. 9931, Αθήνα 23/7/12)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΩΓΡΑΦΟΣ

Καθηγητής Χειρουργικής

ΑΝΔΡΕΑΣ ΜΑΝΟΥΡΑΣ

Καθηγητής Χειρουργικής

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΛΕΑΝΔΡΟΣ

Καθηγητής Χειρουργικής

ΜΑΝΟΥΣΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΥΛΑΚΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής.

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΜΕΝΕΝΑΚΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής.

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΑΛΕΞΑΚΗΣ

Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής.

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΑΛΜΠΑΝΟΠΟΥΛΟΣ

Λέκτορας Χειρουργικής.

Ημερομηνία παρουσίασης: 15/1/2013

Βαθμός: Άριστα

**Ο ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ
Μελέτιος-Αθανάσιος Δημόπουλος**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	14
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι	36
1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	36
2. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	39
3. ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ	39
4. ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ	40
5. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	40
6. ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ	45
1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	45
2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	45
3. ΠΡΟΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	46
4. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	47
5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ	47
6. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ	55
1.ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	55
2. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	55
3. ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	56
4. ΟΡΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	57
5. ΠΡΟΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	58
6. ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	59
7. ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	60
8. ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΕ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗ Η ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟ	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙV	62
1. ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ	62
2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ	67
3. ΘΕΜΕΛΙΩΔΕΙΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ	76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ V	80
1. ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟ	80
2. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΚΑΙ ΥΠΕΡΜΕΘΥΛΙΩΣΗ	86
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	92
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	95
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	96
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	108
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	124
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	130
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	132

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΑΛΕΒΙΖΟΣ
Ημ. γεννήσεως 20/09/1979
Τόπος γεννήσεως Αθήνα
Διεύθυνση Πιπίνου 52 – 112 51 Αθήνα
Τηλέφωνο 210 82 30 446
693 76 54 272
E-mail leonalevizos@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 1995** Αποφοίτηση από το 2^ο Πειραματικό Γυμνάσιο Αθηνών.
- 1997** Αποφοίτηση από το Ενιαίο Πολυκλαδικό Λύκειο Αμπελοκήπων με βαθμό Απολυτηρίου 19,4.
- 2003** Αποφοίτηση από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών με χαρακτηρισμό πτυχίου «ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ».
- 2003** Έναρξη εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής στο Πανεπιστήμιο Αθηνών με θέμα «Ανίχνευση λεμφαδενικών μικρομεταστάσεων σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού».
- 2009** Αποφοίτηση από το μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών του Πανεπιστημίου Αθηνών «Ελάχιστα Επεμβατική Χειρουργική, Ρομποτική Χειρουργική και Τηλεχειρουργική» με χαρακτηρισμό πτυχίου «ΑΡΙΣΤΑ».

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- ΑΓΓΛΙΚΑ:** Certificate of Proficiency in English from University of Cambridge
- ΓΑΛΛΙΚΑ:** Certificat de langue française, DELF I, DELF II (A6)
- ΙΤΑΛΙΚΑ** Επίπεδο B1 (Intermedio)

ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ

- 2000 – 2005** Αμισθο μέλος του Εργαστηρίου Χειρουργικής Έρευνας της Α' Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής του Παν/μίου Αθηνών στο Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο»
- 2003 –2005** Τρίμηνη εκπαίδευση στα πλαίσια της υπηρεσίας υπαίθρου στο Γ.Ν. Λιβαδειάς και τοποθέτηση στο Π.Ι. Άσκησης με απόσπαση για εφημερίες στην Ορθοπαιδική Κλινική του Γ.Ν. Λιβαδειάς.
- 2005-2006** Εκπλήρωση της στρατιωτικής θητείας στην Πολεμική Αεροπορία. Από τον Φεβρουάριο έως τον Οκτώβριο του 2006 διατέλεσα εσωτερικός βοηθός στην Α' Χειρουργική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας με απόσπαση στην ουρολογική κλινική. Στο διάστημα αυτό εφημέρευσα για τις εξής κλινικές: ουρολογική, ορθοπαιδική, νευροχειρουργική και πλαστική χειρουργική.
- 2007-2011** Ειδικευόμενος Γενικής Χειρουργικής στην Α Προπαιδευτική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών. Στο διάστημα αυτό εκτός των άλλων ασκήθηκα στη Μονάδα Μαστού για 1 έτος, στη Λαπαροενδοσκοπική Μονάδα για 15 μήνες και στο Χειρουργικό Εξωτερικό Ιατρείο για 1 έτος. Επιπλέον παρακολούθησα τα εξάμηνα της Ουρολογίας και Ωτορινολαρυγγολογίας.
- 2011** Τρίμηνη εκπαίδευση στην προχωρημένη λαπαροσκοπική χειρουργική με άδεια του ΚΕΣΥ στο νοσοκομείο San Giovanni στη Ρώμη. Στο διάστημα αυτό συνεργάστηκα με τον καθηγητή Marco Maria Lirici παρακολουθώντας όλο το κλινικό και επιστημονικό έργο της Α Χειρουργικής Κλινικής του Νοσοκομείου San Giovanni.

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

Υποτροφία μετά από γραπτή δοκιμασία στα πλαίσια του 10^{ου} Συνεδρίου του Ελληνικού Κολλεγίου Χειρουργών. Αθήνα, 2008.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

1. Post graduate courses on HPB Surgery (2008). European Hepato-Pancreato-Biliary Association. Α' Χειρουργική Κλινική του Κωσταντοπούλειου Νοσοκομείου Νέας Ιωνίας. 2008. (57 CME Credits)
2. Μεταπτυχιακό σεμινάριο “Ιατρική εκπαίδευση με εξομοιωτές. Πρώτο μεταπτυχιακό σεμινάριο λαπαροενδοσκοπικής χειρουργικής” Ιατρική σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών και Ελληνική Εταιρία Ενδοσκοπικής Χειρουργικής. Αθήνα, Φεβρουάριος 2009.
3. Postgraduate course II “Minimally invasive surgery for rectal cancer” during the 17th International congress of the European Association for Endoscopic Surgery. Πράγα, Ιούνιος 2009.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ (ΚΑΤΑΧΩΡΗΜΕΝΑ ΣΤΟ PUBMED)

1. Kaseta MK, Gomatos IP, Khaldi L, Tzagarakis GP, Alevizos L, Themistocleous GS, Leandros E, Soucacos PN. **Prognostic value of bax, cytochrome C, and caspase-8 protein expression in primary osteosarcoma.** Hybridoma. 2007 Dec;26(6):355-62.
2. Kaseta MK, Khaldi L, Gomatos IP, Tzagarakis GP, Alevizos L, Leandros E, Papagelopoulos PJ, Soucacos PN. **Prognostic value of bax, bcl-2, and p53 staining in primary osteosarcoma.** J Surg Oncol. 2008 Mar 1;97(3):259-66.
3. Manouras A, Lagoudianakis E, Alevizos L, Markogiannakis H, Kafiri G, Bramis C, Filis K, Toutouzas K **Laparoscopic fenestration of multiple giant biliary mucinous cystadenomas of the liver.** World J Gastroenterol. 2008 Jul 14;14(26):4257-9.
4. Lagoudianakis EE, Markogiannakis H, Karantzikos G, Papadima A, Alevizos L, Manouras A. **Primary insular carcinoid of the ovary.** Eur J Gynaecol Oncol. 2008;29(5):554-5.
5. Manolopoulos L, Gomatos IP, Leandros E, Alevizos L, Georgiou N, Giotakis J, Ferekidis E. **Use of rituximab in combination with conventional chemotherapy for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma of the head and neck.** In Vivo. 2009 May-Jun;23(3):475-8.
6. Gomatos IP, Alevizos L, Kafiri G, Bramis J, Leandros E. **Management of a small incidentally discovered retroperitoneal synovial sarcoma.** Can J Surg. 2009 Oct;52(5):199-200.
7. Leandros E, Gomatos IP, Konstadoulakis MM, Menenakos E, Alexakis N, Alevizos L, Albanopoulos K, Karagiannakos P, Fingerhut A. **Prospective**

- appraisal of a 2-day training course on laparoscopic sleeve gastrectomy: the ELTC experience.** Surg Endosc. 2010 Sep;24(9):2140-4.
8. Giotakis J, Gomatos IP, Alevizos L, Georgiou AN, Leandros E, Konstadoulakis MM, Manolopoulos L. **Bax, cytochrome c and caspase-8 staining in parotid cancer patients: markers of susceptibility in radiotherapy?** Otolaryngol Head Neck Surg. 2010 Apr;142(4):605-11.
 9. Markogiannakis H, Kekis PB, Memos N, Alevizos L, Tsamis D, Michalopoulos NV, Lagoudianakis EE, Toutouzas KG, Manouras A. **Thyroid surgery with the new harmonic scalpel: A prospective randomized study.** Surgery 2011 Mar;149(3):411-5. Epub 2010 Sep 18.
 10. Gomatos I, Alevizos L, Alexakis N, Sbarounis S, Leandros E, Konstadoulakis M. **Metastatic colon carcinoma to the gallbladder and common hepatic duct. Surgical management of a unique case.** Am Surg. 2011 Feb;77(2):246-7.
 11. Albanopoulos K, Alevizos L, Linardoutsos D, Menenakos E, Stamou K, Vlachos K, Zografos G, Leandros E. **Routine Abdominal Drains after Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: A retrospective Review of 353 Patients.** Obes Surg. 2011 Jun;21(6):687-91.
 12. Albanopoulos K, Alevizos L, Flessas J, Menenakos E, Stamou KM, Papailiou J, Natoudi M, Zografos G, Leandros E. **Reinforcing the staple line during laparoscopic sleeve gastrectomy: prospective randomized clinical study comparing two different techniques. Preliminary results.** Obes Surg. 2012 Jan;22(1):42-6
 13. Stamou KM, Menenakos E, Dardamanis D, Arabatzi C, Alevizos L, Albanopoulos K, Leandros E, Zografos G. **Prospective comparative study of the efficacy of staple-line reinforcement in laparoscopic sleeve gastrectomy.** Surg Endosc. 2011 Nov;25(11):3526-30.
 14. Brinkman WM, Buzink SN, Alevizos L, de Hingh IH, Jakimowicz JJ. **Criterion-based laparoscopic training reduces total training time.** Surg Endosc. 2012 Apr;26(4):1095-1101
 15. Alevizos L, Lirici MM. **Laparo-endoscopic single-site sleeve gastrectomy: results from a preliminary series of selected patients.** Minim Invasive Ther Allied Technol. 2012 Jan;21(1):40-5.
 16. Alevizos L, Stamou KM, Tsamis D, Pattas M, Menenakos E, Zografos GC. **Gallbladder volvulus as a cause of an acute abdomen in a 95-year-old patient.** Am Surg. 2012 Jan;78(1):E47-8.
 17. Alevizos L, Brinkman W, Fingerhut A, Jakimowicz J, Leandros E. **Novice Surgeons Versus Experienced Surgeons in Laparoendoscopic Single-Site**

(LESS) Surgery: A Comparison of Performances in a Surgical Simulator.
World J Surg. 2012 Feb 22 [Epub ahead of print]

18. Alevizos L, Lirici MM. **Laparoscopic intracorporeal distal rectal transection with the CONTOUR (®) device.** Tech Coloproctol. 2012 Mar 17. [Epub ahead of print]
19. Alevizos L, Tsamis D., Koutsoumanis K., Zografos G., Delayed tracheal rupture after thyroidectomy. Am Surg. 2012 Apr;78(4):227-8.
20. Alevizos L, Gomatos IP., Smparounis S., Konstadoulakis MM., Zografos G. **Review of the molecular profile and modern prognostic markers for gastric lymphoma: How do they affect clinical practice?** Accepted for publication in Canadian Journal of Surgery
21. Giotakis E, Gomatos IP, Alevizos L, Manolopoulos L, Kataki A, Kandiloros D, Gorgoulis V, Tsimaratou K, Konstantoulakis MM, Yiotakis I. **Apoptotic and proliferative status in HPV (+) and HPV (-) inverted papilloma patients. Correlation with local recurrence and clinicopathological variables.** Accepted for publication in Pathology - Research and Practice.
22. Albanopoulos K, Alevizos L, Natoudi M, Dardamanis D, Menenakos E, Stamou K, Zografos G, Leandros E. **C-reactive protein, white blood cells, and neutrophils as early predictors of postoperative complications in patients undergoing laparoscopic sleeve gastrectomy.** Surg Endosc. 2012 Oct 6.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΑΛΛΑ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Alevizos L, Fingerhut A., Lirici MM, Leandros E. **The use of simulators in training programs for single access laparoscopic surgery** FOCUS Ospedali D'Italia Chirurgia n. 1-2011.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Λεωνίδας Αλεβίζος. **Αγωνία ενός τελειόφοιτου φοιτητή για την αντιμετώπιση του τραύματος στο μέλλον.** Τραύμα, Τεύχος 5, Μάρτιος 2002
2. Στροφύλας Α, Λαγουδιανάκης Ε, Παππάς Α, Παπαδήμα Α, Αντωνάκης Π, Αλεβίζος Λ, Πανουσόπουλος Σ, Μανουράς Α. **Νεώτερα Δεδομένα στην Επούλωση του Τραύματος.** Αρεταίος (2008)· 1: 1239-42.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Manouras A, Genetzakis M, Lagoudianakis E, Markogiannakis H, Antonakis P, Alevizos L, Kekis P, Katergiannakis V, Bramis J. **Dermoid cyst of the round ligament mimicking an inguinal hernia.** 29th International Congress of the European Hernia Society, May 2007, Athens, Greece.
2. Papadima A, Lagoudianakis E, Boutsikou M, Antonakis P, Kataki A, Alevizos L, Georgiou L, Manouras A. **CRP, ESR and serum Cortisol levels in patients with colon cancer.** 3rd International Congress of Gastrointestinal Oncology. June 2007, Crete, Greece.
3. Alevizos L, Lagoudianakis E, Markogiannakis H, Larentzakis A, Papailiou I, Kantsos H, Pararas N, Toutouzas K, Katergiannakis V, Manouras A. **Laparoscopic fenestration of multiple giant biliary mucinous cystadenomas of the liver.** 8th Congress of the European Hepato-Pancreato-Biliary Association. June 2009. Athens.
4. Michalopoulos NV, Papadima A, Lagoudianakis E, Panousopoulos SG, Toufektzian L, Alevizos L, Markogiannakis H, Manouras A. **Primary cavernous aemangioma of the thyroid gland.** 11th European Congress of Endocrinology, April 2009, Istanbul.
5. Alevizos L, Michalopoulos NV, Markogiannakis H, Memos N, Tsamis D, Linardoutsos D, Kekis P.B, Manouras A. **Thyroid surgery with the new harmonic scalpel: a prospective randomized study.** 11th European Congress of Endocrinology, April 2009, Istanbul.
6. Alevizos L, Markogiannakis H, Kekis PB, Papadima A, Sigala F, Filis K, Toutouzas K, Manouras A. **Coexistence of hyperparathyroidism and non-medullary thyroid carcinoma.** 11th European Congress of Endocrinology, April 2009, Istanbul.
7. Michalopoulos NV, Alevizos L, Markogiannakis H, Memos N, Giannopoulos A, Malachtari S, Kekis PB, Manouras A. **Predictors of incidental parathyroidectomy during thyroid surgery.** 11th European Congress of Endocrinology, April 2009, Istanbul.
8. Markogiannakis H, Alevizos L, Tsamis D, Michalopoulos NV, Kantsos H, Terzis A, Papadima A, Lagoudianakis E, Kekis PB, Malaktari S, Kiriakou G, Manouras A. **Focused parathyroidectomy with intraoperative parathormone monitoring.** 13th Surgical Week, July 2009, Chalkidiki, Greece.
9. Markogiannakis H, Alevizos L, Tsamis D, Michalopoulos NV, Kantsos H, Terzis A, Kekis P.B, Giannopoulos A, Kafiri G, Manouras A. **Prospective randomized study of thyroid surgery using the new harmonic scalpel**

- versus the electrothermal bipolar sealer.** 13th Surgical Week, July 2009, Chalkidiki, Greece.
10. Kekis PB, Michalopoulos NV, Tsamis D, Alevizos L, Memos N, Markogiannakis H, Evagelidakis E, Liparaki M, Kafiri G, Malachtari S, Manouras A. **Laparoscopic adrenalectomy in a university surgery department.** 13th Surgical Week, July 2009, Chalkidiki, Greece.
 11. Manouras A, Kekis PB, Alevizos L, Memos N, Michalopoulos NV, Papadima A, Lagoudianakis E, Markogiannakis H. **Thyroid surgery with the new harmonic scalpel or the electrothermal bipolar vessel sealer: a prospective study.** International Surgical Week ISW 2009. The 43rd World Congress of the International Society of Surgery (ISS). Adelaide, September 2009.
 12. Tsamis D, Alevizos L, Michalopoulos NV, Memos N, Kantsos H, Terzis A, Markogiannakis H, Kekis PB, Kiriakou G, Malaktari S, Manouras A. **Prospective randomized study of thyroid surgery using the harmonic scalpel.** Annual Meeting of the European Thyroid Association. Lisbon, September 2009.
 13. Michalopoulos NV, Tsamis D, Alevizos L, Kontogianni P, Natoudi M, Kleidi E, Linardoutsos D, Flessas I, Peitsidou K, Markogiannakis H, Manouras A. **Application of 2-octolcyanoacrylate tissue adhesive in total thyroidectomies with a modified technique compared to subcuticular suturing: a prospective randomized study.** Annual Meeting of the European Thyroid Association. Lisbon, September 2009
 14. Papadima A, Tsamis D, Alevizos L, Michalopoulos NV, Lagoudiannakis H, Antonakis P, Markogiannakis H, Makri I, Kiriakou G, Malaktari S, Gouliami M, Manouras A. **Granisetron vs. tropisetron in the prevention of postoperative nausea and vomiting after total thyroidectomy.** The 43rd World Congress of the International Society of Surgery (ISS). Annual Meeting of the European Thyroid Association. Lisbon, September 2009.
 15. Kekis PB, Markogiannakis H, Michalopoulos NV, Alevizos L, Tsamis D, Kantsos H, Terzis A, Evagelidakis E, Liparaki M, Kiriakou G, Malaktari S, Manouras A, **Laparoscopic adrenalectomy for big non-functioning adenomas.** New European Surgical Academy (NESA) CONGRESS 2009, May 2009, Athens, Greece.
 16. Markogiannakis H, Alevizos L, Tsamis D, Michalopoulos NV, Kantsos H, Terzis A, Papadima A, Lagoudianakis E, Kekis PB, Malaktari S, Kiriakou G, Manouras A. **Focused parathyroidectomy with intraoperative parathyroid hormone monitoring: preliminary results.** New European Surgical Academy (NESA) CONGRESS 2009, May 2009, Athens, Greece. New European Surgical Academy (NESA) CONGRESS 2009, May 2009, Athens, Greece.

17. Filippakis G, Gomatos IP, Konstadoulakis M.M, Alevizos L, Chatzigianni E, Flessas I, Tsigris C, Zografos G, Leandros E. **Identification of a high-risk subgroup of colorectal carcinoma patients using apoptosis related immunohistochemical markers.** New European Surgical Academy (NESA) CONGRESS 2009, May 2009, Athens, Greece.
18. Alevizos L, Koutroutsos K, Papadakis I, Chatzivasiliou G, Katergiannakis I, Flessas I, Terzis A, Bramis I. **Modified technique for peritoneal catheter insertion: results from one center.** New European Surgical Academy (NESA) CONGRESS 2009, May 2009, Athens, Greece.
19. Flessas I, Zagouri F, Alevizos L, Gianopoulos P, Gomatos I, Chrysicos D, Tsamis D, Stamopoulos P, Katsivalis P, Wasim M, Zografos G. **Non-invasive methods: Do they have a role in the detection of micrometastasis in axillary lymph nodes?** New European Surgical Academy (NESA) CONGRESS 2009, May 2009, Athens, Greece.
20. Lagoudianakis EE, Markogiannakis H, Alevizos L, Karantzikos G, Papadima A, Flessas I, Manouras A, Bramis I. **Primary insular carcinoid of the ovary.** New European Surgical Academy (NESA) CONGRESS 2009, May 2009, Athens, Greece.
21. Kaseta MK, Gomatos I, Alevizos L, Khaldi L, Tzagarakis G, Soucacos P, Leandros E. **Prognostic value of p53, bax, bcl-2, cytochrome c and caspase-8 staining in primary osteosarcoma.** New European Surgical Academy (NESA) CONGRESS 2009, May 2009, Athens, Greece.
22. Gomatos IP, Alevizos L, Kafiri G, Bramis J, Leandros E. **Management of a small incidentally discovered retroperitoneal synovial sarcoma.** New European Surgical Academy (NESA) CONGRESS 2009, May 2009, Athens, Greece.
23. Alevizos L, Papadima A, Markogianakis H, Lagoudianakis E, Antonakis P., Michalopoulos N, Makri I, Gouliami M, Leandros E, Manouras A. **Repeated intraperitoneal levobupivacaine instillation for the Management of pain alter laparoscopic cholecystectomy.** 17th International congress of the European Association for Endoscopic Surgery. Prague, June 2009.
24. Alevizos L, Lagoudiannakis E, Antonakis P, Evagelidakis E, Malaktari S, Leandros E, Manouras A. **Laparoscopic adrenalectomy in an endocrine surgery department in Greece.** 17th International congress of the European Association for Endoscopic Surgery. Prague, June 2009.
25. Tsamis D, Toutouza M, Petrochilou A, Malaktari S, Natoudi M, Alevizos L, Kleidi E, Markogiannakis H, Koutsoumanis K, Manouras A. **Prospective randomized controlled study of local anesthetic wound infiltration in total thyroidectomy.** 4th Biennial Congress of the European Society of Endocrine Surgeons. Vienna, May 2010.

26. Tsamis D, Malaktari S, Petrochilou A, Toutouza M, Natoudi M, Alevizos L, Markogiannakis H, Koutsoumanis K, Manouras A, Zografos G. **Predictive value of perioperative vitamina D and PTH measurement in total thyroidectomy.** 4th Biennial Congress of the European Society of Endocrine Surgeons. Vienna, May 2010.
27. Tsamis D, Natoudi M, Alevizos L, Manouras I, Papadima A, Lagoudianakis E, Markogiannakis H, Kekis PB, Manouras A. **Prospective randomised double-minded controlled study of local anesthetic wound infiltration in total thyroidectomy.** 14th international thyroid congress. Paris, September 2010.
28. Lirici MM, Alevizos L, Califano A, Maiuri A. **D2 total gastrectomy for locally advanced gastric cancer in a patient non responder to neo-adyuvant chemotherapy.** 22° Congresso di Chirurgia dell'Apparato Digerente. Rome, May 2011.
29. Maiuri A, Alevizos L, Lirici MM. **Laparoscopic low anterior resection and TME with an original technique for rectal transection with a curved cutter in obese patients.** 22° Congresso di Chirurgia dell'Apparato Digerente. Rome, May 2011.
30. Alevizos L, A. Maiuri, M.M. Lirici. **Laparoscopic Nissen-Rossetti fundoplication after failure of ELF by esophyx.** 22° Congresso di Chirurgia dell'Apparato Digerente. Rome, May 2011.
31. Lirici MM, Alevizos L, Maiuri A. **Laparoscopic left liver lobectomy.** 15th National Congress of the Italian Society of Endoscopic Surgery (S.I.C.E.) in collaboration with 19th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). Torino, June 2011.
32. Alevizos L, Califano A, Lirici MM. **Laparoscopic Nissen fundoplication after failure of Esophyx transoral incisionless fundoplication.** 15th National Congress of the Italian Society of Endoscopic Surgery (S.I.C.E.) in collaboration with 19th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). Torino, June 2011.
33. Alevizos L, Califano A, Lirici MM. **Laparoscopic low anterior resection with TME in obese patient with curved stapler rectal transaction.** 15th National Congress of the Italian Society of Endoscopic Surgery (S.I.C.E.) in collaboration with 19th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). Torino, June 2011.
34. Alevizos L, Maiuri A, Califano A Lirici M.M. **Laparoscopic low anterior resection with TME with curved stapler rectal transaction.** 4th World Congress of Coloproctology and Pelvic Diseases. Rome, June 2011.
35. Lirici MM, Alevizos L. **Laparoendoscopic single sleeve gastrectomy: technique and early results.** 23rd Conference of the Society for Medical Innovation and Technology. Tel Aviv, September 2011.

36. Lirici MM, Alevizos L. **Laparoscopic intracorporeal rectal transection with a curved cutter: an original technique in a series of 34 patients.** 23rd Conference of the Society for Medical Innovation and Technology. Tel Aviv, September 2011.
37. Lirici MM, Maiuri A, Alevizos L. **Laparoscopic anterior resection and TME in obese patient with transection of medial rectum with “curved cutter”.** 113° Congresso della Societa' Italiana di Chirurgia. Firenze, October 2011.
38. Lirici MM, Alevizos L, Califano A. **Laparoscopic Re-do Nissen Fundoplication After Failure of Esophyx Transoral Incisionless Fundoplication.** 97th annual clinical congress of the american college of surgeons. San Francisco, October 2011.
39. Alevizos L, Albanopoulos K, Linardoutsos D, Menenakos E, Stamou KM, Vlachos K, Zografos G, Leandros E. **Routine Abdominal Drains after Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: A retrospective review of 353 patients.** 19th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). Torino, June 2011.
40. Alevizos L, Albanopoulos K, Flessas J, Natoudi M, Zografos G, Leandros E. **Staple line reinforcement with suturing: a prospective randomized study. Preliminary results.** 19th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). Torino, June 2011.
41. Alevizos L, Kalathaki O, Gomatos IP, Kantsos H, Katakaki A, Leandros E, Konstantoulakis M, Zografos G. **Immune and metabolic response after laparoscopic and open cholecystectomy.** 19th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). Torino, June 2011.
42. Alevizos L, Jakimowicz J.J, Fingerhut A, Brinkman WM, Albanopoulos K, Stamou KM, Menenakos E, Zografos G, Leandros E. **Comparison of classic laparoscopic simulator vs. SILS simulator in novice and advanced trainees.** 19th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). Torino, June 2011.
43. Brinkman WM, Buzink SN, Alevizos L, Jakimowicz JJ. **Criterion-based laparoscopic training reduces total training time.** 19th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). Torino, June 2011.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Δαρώμ Α, Γομάτος Η, Λεάνδρος Ε, Αλεβίζος Λ, Χατζηγιάνη Ε, Αλεξανδρόπουλος Ν, Κωνσταντουλάκης Μ, Ανδρουλάκης Γ. **Η έκφραση του αντιγόνου HLA-DR και της πρωτεΐνης BAX σε ασθενείς με πρωτοπαθές μη HODGKIN γαστρικό λέμφωμα.** Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο 2002
2. Κατσογιάννη Α, Χριστοφέλη Α, Κοτσομούτης Ι, Αλεβίζος Λ, Μαυρομιχάλη Ζ, Τσετσέκου Ε, Χρυσικόπουλος Γ, Μιχάλης Δ. **Αιτίες θανάτου στο Δήμο Αλιάρτου την τελευταία πενταετία.** 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής 2005
3. Μανουράς Α, Μαρκογιαννάκης Χ, Παραράς Ν, Δαρδαμάνης Δ, Γομάτος Η, Πανουσόπουλος Σ, Τρομπούκης Α, Τουφεκτζιάν Λ, Μιχαλόπουλος Ν, Κλειδί Ε, Νατούδη Μ, Αλεβίζος Λ, Μπράμης Ι. **Οι κήλες ως αιτίες αποφρακτικού ειλεού.** 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο και International Forum του Ελληνικού Κολλεγίου Χειρουργών. Αθήνα, Απρίλιος 2007.
4. Μανουράς Α, Μέμος Ν, Μιχαλόπουλος Ν, Αλεβίζος Λ, Παπανικολάου Δ, Παπαδήμα Α, Λαγουδιανάκης Ε, Μαρκογιαννάκης Χ, Φίλης Κ, Τούτουζας Κ, Κέκης Π. **Προγνωστικοί παράγοντες της κατά λάθος παραθυρεοειδεκτομής στις θυρεοειδεκτομές: Ο ρόλος του φύλου.** 26^ο Πανελλήνιο Συνέδριο και Διεθνές Φόρουμ Χειρουργικής. Αθήνα, Νοέμβριος 2008.
5. Μανουράς Α, Κέκης Π, Αλεβίζος Λ, Μέμος Ν, Μιχαλόπουλος Ν, Πανουσόπουλος Σ, Τσάμης Δ, Λαγουδιανάκης Ε, Μαρκογιαννάκης Χ. **Ολική Θυρεοειδεκτομή με το νέο ψαλίδι υπερήχων (focus): Προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη σύγκρισης με το harmonic ace.** 26^ο Πανελλήνιο Συνέδριο και Διεθνές Φόρουμ Χειρουργικής. Αθήνα, Νοέμβριος 2008.
6. Μαρκογιαννάκης Χ, Μέμος Ν, Παπανικολάου Δ, Αλεβίζος Λ, Κοντογιάννη Π, Αλεξανδρόπουλος Ν, Λαγουδιανάκης Ε, Παπαδήμα Α, Κατεργιαννάκης Β, Μανουράς Α. **Κλινικοεργαστηριακοί προγνωστικοί παράγοντες εντερικού στραγγαλισμού στον αποφρακτικό ειλέο παχέος εντέρου.** 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Παχέος Εντέρου- Πρωκτού. Αθήνα, Μάιος 2009.
7. Μιχαλόπουλος Ν, Παναγιώτης Κ, Μαρκογιαννάκης Χ, Αλεβίζος Λ, Λαγουδιανάκης Ε, Ευαγγελιδάκης Ε, Μαλακτάρη Σ, Μανουράς Α. **Λαπαροσκοπική επινεφριδεκτομή: Αποτελέσματα κατά τη χρονική περίοδο 2006-2008.** 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής και Διεθνές Συμπόσιο. Αθήνα, Μάιος 2009.
8. Παπαδήμα Α, Λαγουδιανάκης Ε, Αντωνάκης Π, Μαρκογιαννάκης Χ, Αλεβίζος Λ, Μιχαλόπουλος Ν, Μακρή Η, Τούτουζας Κ, Γουλιάμη Μ, Μανουράς Α. **Επαναλαμβανόμενη ενδοπεριτοναϊκή έγχυση λεβομπουπιβακαΐνης για την αντιμετώπιση του άλγους μετά από λαπαροσκοπική χολοκυστεκτομή.** 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο

Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής και Διεθνές Συμπόσιο. Αθήνα, Μάιος 2009.

9. Μέμος Ν, Μαλακτάρη Σ, Πετροχείλου Α, Τούτουζα Μ, Γομάτος Η, Αλεβίζος Δ, Τσάμης Δ, Γιαννόπουλος Α, Αθανασίου Β, Τόλης Γ, Μαρκογιαννάκης Χ, Μανουράς Α. **Η σημασία της περιεγχειρητικής μέτρησης της βιταμίνης D και της παραθορμόνης στη χειρουργική του θυρεοειδούς αδένα.** 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Ενδοκρινών Αδένων. Θεσσαλονίκη, Νοέμβριος 2009.
10. Αλεβίζος Δ, Αλεξανδρόπουλος Ν, Κραββαρίτου Μ, Μαλακτάρη Σ, Αθανασίου Β, Τόλης Γ, Ζουμπούλη Χ, Πλαστήρας Α, Μαρκογιαννάκης Χ, Μανουράς Α. **Η χρήση της διεγχειρητικής μέτρησης της παραθορμόνης στη στοχευμένη και την κλασσική παραθυρεοειδεκτομή για μονήρη αδενώματα παραθυρεοειδούς.** 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Ενδοκρινών Αδένων. Θεσσαλονίκη, Νοέμβριος 2009.
11. Μαρκογιαννάκης Χ, Μέμος Ν, Μεσσάρης Ε, Τουφεκτζιάν Λ, Πανουσόπουλος Σ, Αλεβίζος Δ, Κλειδή Ε, Νατούδη Μ, Φλέσσας Ι, Λαγουδιανάκης Ε, Κατεργιαννάκης Β, Μανουράς Α. **Οι κήλες ως αίτιο αποφρακτικού ειλεού παχέος εντέρου.** 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κήλης. Αθήνα, Νοέμβριος 2009.
12. Αλεβίζος Δ, Δαρδαμάνης Δ, Κοντογιάννη Π, Λιναρδούτσος Δ, Κοτζαδημητρίου Α, Δαλιανούδης Ι, Παπαχρηστίδου Σ, Πάνταλος Γ, Μαρκογιαννάκης Χ, Μανουράς Α. **Η χρήση της ταχείας διεγχειρητικής μέτρησης της παραθορμόνης στην ελάχιστα επεμβατική παραθυρεοειδεκτομή.** 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο του Ελληνικού Κολλεγίου Χειρουργών. Αθήνα, Απρίλιος 2010.
13. Στάμου Κ, Αλεβίζος Δ, Τσάμης Δ, Πάττας Μ, Σαμαντά Ε, Εμμανουήλ Θ, Μενενάκος Ε. **Συστροφή χοληδόχου κύστεως ως αίτιο οξείας κοιλίας σε ασθενή 95 ετών.** 27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2010. Αθήνα, Νοέμβριος 2010.
14. Παπίρης Κ, Αντωνάκης Π, Αλεβίζος Δ, Φλέσσας Ι, Γομάτος Η. Π, Κυριακού Σ, Δενδρινός Χ, Ρωμάνος Α. **Η Διαδερμική Ενδοσκοπική Γαστροστομία (PEG) μπορεί να εφαρμοστεί και σε περιπατητικούς ασθενείς.** Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2010. Αθήνα, Νοέμβριος 2010.
15. Στάμου Κ, Θεοδωρόπουλος Γ, Δαρδαμάνης Δ, Σταμόπουλος Π, Αλμπανόπουλος Κ, Μενενάκος Ε, Αλεβίζος Δ, Λέανδρος Ε, Ζωγράφος Γ. **Προοπτική συγκριτική μελέτη της λεμφαδενεκτομής σε ανοικτές και λαπαροσκοπικές επεμβάσεις για ορθοκολικό καρκίνο.** Πανελλήνιο

Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2010. Αθήνα, Νοέμβριος 2010.

16. Τσάμης Δ, Παπαβασιλείου Ε, Μαμαλάκη Ε, Δαράκη Η, Τζουτζουράκη Π, Αλεβίζος Δ, Δεληστάθη Χ, Μαρκογιαννάκης Χ, Μανουράς Α. **Προοπτική μελέτη των προγνωστικών παραγόντων της υπασβεστιαμίας μετά από ολική θυρεοειδεκτομή.** Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2010. Αθήνα, Νοέμβριος 2010.
17. Αλμπανόπουλος Κ, Φλέσσας Ι, Μενενάκος Ε, Στάμου Κ, Πανουσόπουλος Σ.-Γ, Αλεβίζος Δ, Παπίρης Κ, Ανέστη Ζ, Μήτρη Χ, Κολιοπάνος Σ, Λέανδρος Ε, Ζωγράφος Γ. **Οικονομική μελέτη χρησιμοποίησης ενισχυτικών συρραφής κατά τη Χρησιμοποίηση LSG.** Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2010. Αθήνα, Νοέμβριος 2010.
18. Αλεβίζος Δ, Λιναρδούτσος Δ, Φλέσσας Ι, Αλμπανόπουλος Κ, Μενενάκος Ε, Στάμου Κ, Λέανδρος Ε, Ζωγράφος Γ. **Αναδρομική μελέτη της χρησιμότητας των παροχετεύσεων σε 353 Ασθενείς που υπεβλήθησαν σε λαπαροσκοπική επιμήκη γαστρεκτομή.** Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2010. Αθήνα, Νοέμβριος 2010.
19. Στάμου Κ, Μενενάκος Ε, Αλεβίζος Δ, Νατούδη Μ, Γομάτος Η. Π, Λέανδρος Ε, Ζωγράφος Γ. **Διεγχειρητικές επιπλοκές κατά τη διάρκεια λαπαροσκοπικής επιμήκου γαστρεκτομής. Βιντεοεπιλογή από 340 επεμβάσεις.** Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2010. Αθήνα, Νοέμβριος 2010. Α' Βραβείο Παρουσίασης.
20. Λιναρδούτσος Δ, Λαρεντζάκης Α, Αλεβίζος Δ, Πανουσόπουλος Σ.-Γ, Μαρκογιαννάκης Χ, Κέκης Π.-Β, Θεοδώρου Δ, Τούτουζας Κ, Μανουράς Α, Ζωγράφος Γ. **Νευροενδοκρινείς Όγκοι παγκρέατος και ανωτέρου πεπτικού. Αποτελέσματα μιας τετραετίας.** 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Ενδοκρινών Αδένων. Αθήνα, Νοέμβριος 2011.
21. Κότζα Δημητρίου Α, Παπαηλίου Ι, Δαλιανούδης Ι, Λαρεντζάκης Α, Κλειδή Ε, Αλεβίζος Δ, Μαρκογιαννάκης Χ, Καφίρη Γ, Κουτσομάνης Κ, Μανουράς Α, Ζωγράφος Γ. **Ιστολογικά ευρήματα θυρεοειδεκτομών: Ανάλυση μιας οκταετίας.** Αθήνα, Νοέμβριος 2011.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΑΛΛΩΝ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. Molecular Screening of Individuals at High-Risk of Developing Cancer: Medical, Ethical, Legal and Social Issues. Athens, March 1999.
2. 12th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. Athens, September 2006.
3. 5th Symposium on New Molecules in Cancer Therapeutics. Athens, November 2006.
4. 4th Congress of the Italian Chapter and 7th congress of the European Chapter of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association (IHPBA). Verona, June 2007.
5. 15th International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery. Athens, July 2007.
6. The 1st Emirates Hellenic Medical Conference & Exhibition. Dubai, December 2007.
7. 3rd International Experts' Meeting on Advanced Laparoscopic Surgery. Athens, September 2010 (12 CME credits)
8. The Triple S Symposium Single Site Surgery Symposium. Rome, November 2010.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. 2^η Επιστημονική Ημερίδα Μονάδας Μαστού Α΄ Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών : «Η επεμβατική Τεχνολογία στη διάγνωση του πρώιμου καρκίνου του μαστού»
2. 3^η Επιστημονική Ημερίδα Μονάδας Μαστού, Α΄ Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών: «Τεχνολογικές και φαρμακευτικές εξελίξεις στον καρκίνο του μαστού».
3. Τεχνολογικές εξελίξεις στη χειρουργική πράξη. Επιστημονική Διημερίδα Ελληνικής Χειρουργικής Εταιρίας. Αθήνα, 13-14 Ιανουαρίου 2006.
4. Από την χειρουργική αντιμετώπιση της παχυσαρκίας στην μεταβολική χειρουργική. Μονάδα βariatρικής και μεταβολικής χειρουργικής 1st department of Propaedeutic Surgery, University of Athens. Αθήνα, Μάρτιος 2011.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΑΛΛΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. 6^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος. Θεσ/νίκη, Μάιος 2000.
2. 23^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Φόρουμ. Αθήνα, Νοέμβριος 2002.
3. 22^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστροεντερολογίας. Αθήνα, Νοέμβριος 2002.
4. 18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευρολογίας. Αθήνα, Νοέμβριος 2002.
5. 29^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο. Αθήνα, Μάιος 2003.
6. Διαλέξεις Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης στη Μαιευτική και Γυναικολογία Αρεταιείου Νοσοκομείου Αθηνών (Αθήνα, Απρίλιος – Μάιος 2003) με θέματα:
 - a. «Διαγνωστική Προσπέλαση Υπογόνιμου Ζευγαριού»
 - b. «Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή»
 - c. «Αυτοάνοσα Νοσήματα και Κύηση»
 - d. «Η Ορμονική Θεραπεία Υποκατάστασης και οι Συνέπειές της στο Καρδιαγγειακό Σύστημα και στον Καρκίνο του Μαστού»
7. Δημερίδα με θέμα «Προετοιμασία Νέων Ιατρών για την Υπηρεσία Υπαίθρου». Αθήνα, Μάρτιος 2003.
8. 2^ο Ετήσιο Διεθνές Συνέδριο Καρδιολογίας και Καρδιοχειρουργικής. Αθήνα, Μάιος 2003.
9. Ημερίδα με θέμα «Θεραπεία Καταγμάτων, Επιπλοκών Καταγμάτων και Συγγενών Παθήσεων των Άκρων με Χρήση της Μεθόδου Εξωτερικής Οστεοσύνθεσης». Λειβαδιά, Νοέμβριος 2004.
10. 3^η Επιστημονική Ημερίδα «Τεχνολογικές και Φαρμακευτικές Εξελίξεις στον Καρκίνο του Μαστού». Αθήνα, Μάιος 2005.
11. 8^ο Θεματικό Συνέδριο «Εντατική Θεραπεία και Επείγουσα Ιατρική: Τραύμα» (9 CME CREDITS). Αθήνα, Νοέμβριος 2005.
12. Επιστημονική Δημερίδα «Τεχνολογικές Εξελίξεις στη Χειρουργική Πράξη» (6 CME CREDITS). Αθήνα, Ιανουάριος 2006.
13. 2^ο Συμπόσιο για την Απεικόνιση του Μαστού (15 CME CREDITS). Αθήνα, Οκτώβριος 2006.
14. 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ψυχοκοινωνικής Ογκολογίας (18 CME CREDITS). Αθήνα, Νοέμβριος 2006.

15. 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας. Αθήνα, Νοέμβριος 2006.
16. 6^η Επιστημονική Ημερίδα Ελληνικής Εταιρίας Ελέγχου Λοιμώξεων (6 CME CREDITS). Αθήνα, Νοέμβριος 2006
17. 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας (10 CME CREDITS). Νοέμβριος 2006.
18. 27^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο (15 CME CREDITS). Αθήνα, Νοέμβριος 2006.
19. 5^ο Σεμινάριο με θέμα «Ψυχοκοινωνική Στήριξη του Παιδιού με Καρκίνο και της Οικογένειάς του». Αθήνα, Νοέμβριος 2006.
20. 27^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο. Αθήνα, Νοέμβριος 2006.
21. 19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματολογίας. Αθήνα, Νοέμβριος 2006
22. 25^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής (27 CME CREDITS). Αθήνα, Νοέμβριος 2006.
23. 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης (21 CME CREDITS). Αθήνα, Δεκέμβριος 2006.
24. 3^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Λοιμώξεων (12 CME CREDITS). Αθήνα, Δεκέμβριος 2006.
25. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παγκρεατολογίας. Αθήνα, Δεκέμβριος 2006.
26. 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ουρογυναικολογίας και Αποκαταστάσεως Διαταραχών του Πυελικού Εδάφους. Αθήνα, Φεβρουάριος 2007.
27. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής (18 CME CREDITS). Αθήνα, Ιούλιος 2007.
28. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας. Αθήνα, Φεβρουάριος 2007. 4^η Επιστημονική Διημερίδα με θέμα «Αμφιλεγόμενα Σημεία στον Καρκίνο του Μαστού». Αθήνα, Νοέμβριος 2007.
29. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο και Διεθνές Φόρουμ Ελληνικού Κολλεγίου Χειρουργών. (15 CME CREDITS). Αθήνα, Απρίλιος 2008.
30. Διημερίδα με θέμα «Αντιμετώπιση Ηπατικών Μεταστάσεων από Καρκίνο Παχέος Εντέρου». Αθήνα, Οκτώβριος 2008.
31. 26^ο Πανελλήνιο Συνέδριο και Διεθνές Φόρουμ Χειρουργικής (24CME CREDITS). Αθήνα, Νοέμβριος 2008.
32. 5^ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Τραύματος και Επείγουσας Χειρουργικής (18 CME CREDITS). Αθήνα, Φεβρουάριος 2009.

33. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο και Διεθνές Συμπόσιο Λαπαροενδοσκοπικής Χειρουργικής. Αθήνα, Μάιος 2009.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΗ ΣΥΓΓΡΑΜΑΤΩΝ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ

1. «Κήλες κοιλίας. Σύγχρονες απόψεις». Α.Μανουράς, Ν. Αποστολίδης, Π. Κέκης, Ε. Λαγουδιανάκης, Χ. Μαρκογιαννάκης, Σ.Γ. Πανουσόπουλος, Λ. Αλεβίζος. Αθήνα, 2008. Εκδ. Πασχαλίδης.
2. Τιμητικός Τόμος του Ομότιμου Καθηγητού της Χειρουργικής του Πανεπιστημίου Αθηνών Γεώργιου Ανδρουλάκη. Κεφάλαιο 11. «Ολική θυροειδεκτομή: προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη σύγκρισης του νέου ψαλιδίου υπερήχων focus με το harmonic ace». Μανουράς Α, Μαρκογιαννάκης Χ, Κέκης Π, Αλεβίζος Λ, Μέμος Ν, Μιχαλόπουλος Ν, Τσάμης Δ, Μπράμης Κ, Λαγουδιανάκης Ε, Τούτουζας Κ, Κατεργιαννάκης Β. Αθήνα, 2009. Εκδ. Επτάλοφος

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη συχνότερη μορφή καρκίνου στις γυναίκες παγκοσμίως και κάθε έτος καταγράφονται περίπου 460.000 θάνατοι από τη νόσο.¹ Παρά την συνεχιζόμενη έρευνα, ο μηχανισμός της καρκινογένεσης στον καρκίνο του μαστού δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός, ενώ οι υποτροπές και η θνησιμότητα παραμένουν σε υψηλά επίπεδα, με εξαίρεση τα αρχικά στάδια της νόσου που έχουν συνήθως καλή πρόγνωση. Από κλινικής απόψεως, εκείνο που μειώνει σημαντικά την επιβίωση και αυξάνει τις υποτροπές της νόσου είναι η χορήγηση λεμφαδενικών και απομακρυσμένων μεταστάσεων. Επιπλέον, ένα ποσοστό ασθενών χωρίς λεμφαδενική διήθηση στην παθολογοανατομική έκθεση, το οποίο σε ορισμένες δημοσιεύσεις φτάνει και το 30%, θα υποτροπιάσει, πιθανώς εξαιτίας της αδυναμίας της κλασικής χρώσης με αιματοξυλίνη και ηωσίνη να ανιχνεύσει την λεμφαδενική μικρομετάσταση του καρκίνου του μαστού.² Με βάσει τα παραπάνω, καθίσταται σημαντική η ανεύρεση νέων μοριακών δεικτών που θα μπορούσαν να μας βοηθήσουν στην καλύτερη ανίχνευση της λεμφαδενικής μικρομετάστασης και στην πρόβλεψη της υποτροπής της νόσου, συμβάλλοντας και στην λήψη αποφάσεων όσον αφορά τους θεραπευτικούς χειρισμούς.³

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει εστιασθεί στην επιγενετική αναστολή της έκφρασης διαφόρων ογκοκατασταλτικών γονιδίων και στη συμβολή τους στην διαδικασία καρκινογένεσης του καρκίνου του μαστού.⁴ Ως επιγενετικές θεωρούνται οι αλλαγές του γενετικού υλικού που δεν χαρακτηρίζονται από τροποποίηση της αλληλουχίας των βάσεων αλλά από βιοχημική τροποποίηση με μεθυλίωση ρυθμιστικών αλληλουχιών που βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων όπως είναι οι αλληλουχίες CpG. Η μεθυλίωση εμποδίζει την

έκφραση του γονιδίου και κατά συνέπεια τις λειτουργίες αυτού.⁵ Αρκετά γονίδια φαίνεται από προηγούμενες μελέτες να μεθυλιώνονται στον καρκίνο του μαστού. Εξ'αυτών, τα RAR-β, Cyclin D2 και Twist είναι βασικοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου με υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης στον καρκίνο του μαστού, ενώ στον φυσιολογικό μαστικό αδένα η μεθυλίωση τους θεωρείται σπάνιο φαινόμενο.⁶⁻⁹ Επιπλέον, τα CXCR4 και Caveolin-1 που επίσης βρίσκονται σε υψηλά ποσοστά μεθυλιωμένα στον καρκίνο του μαστού φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού και στην μετάσταση του.^{10,11} Στο παρόν πόνημα μελετήθηκε η μεθυλίωση των παραπάνω γονιδίων στον καρκίνο του μαστού, αξιολογήθηκε η δυνατότητα της να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης ανίχνευσης της κακοήθειας καθώς και ο ρόλος της στην πρόγνωση, την μετάσταση και την υποτροπή των ασθενών με καρκίνο του μαστού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο μαστός είναι ένα όργανο αναρτημένο στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα, αποτελούμενο από ένα άθροισμα διαφοροποιημένων αδένων του δέρματος. Εκτείνεται από τη 2^η μέχρι την 6-7^η πλευρά και από το έξω στερνικό χείλος μέχρι την πρόσθια μασχालιαία γραμμή.

Στο ύψος του 4^{ου} μεσοπλεύριου διαστήματος και στο έξω πλάγιο της μέσης μαζικής γραμμής εδράζεται η θηλή, η οποία περιβάλλεται από μια ελαφρά υπερχρωσμένη περιοχή με διάμετρο 3-5 εκ., τη θηλαία άλω, στην οποία καταλήγουν οι 15-20 εκφορητικοί πόροι του μαζικού αδένου. Η θηλή και ο χώρος κάτω από τη θηλαία άλω χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών λείων μυϊκών ινών οι οποίες καταφύονται στη βάση του δέρματος της θηλής και κατανέμονται ακτινωτά. Η λειτουργία τους συνίσταται στην ανόρθωση της θηλής μετά από απτικό ερέθισμα και στην ευκολότερη εκκένωση των εκφορητικών πόρων.

Ο μαστικός αδένου περιλαμβάνει 15-20 λοβούς με τους εκφορητικούς τους πόρους που ονομάζονται και γαλακτοφόροι πόροι και περιβάλλεται από την επιπολής λιπώδη και την εν τω βάθει μεμβρανώδη στιβάδα της επιπολής θωρακικής περιτονίας. Το σχήμα του είναι σφαιροειδές, εκτός από ένα τμήμα του που παρουσιάζει μια προσεκβολή προς τα άνω και έξω κατά μήκος του χείλους του μείζονος θωρακικού μυός προς τη μασχάλη, την ουρά του Spence¹²

A. Αγγείωση του μαστού

i) Αρτηρίες

Η πλούσια αιμάτωση του μαστού επιτυγχάνεται κυρίως από 3 αρτηριακούς κλάδους:

1. Τους διαιτιτραίνοντες κλάδους της έσω μαστικής αρτηρίας.
2. Τους μαστικούς κλάδους της πλάγιας ή έξω θωρακικής αρτηρίας.
3. Το θωρακικό κλάδο της ακρωμιοθωρακικής αρτηρίας.

Άλλες αρτηρίες που αιματώνουν σε μικρότερο ποσοστό το μαστό είναι:

4. Η ανωτάτη θωρακική αρτηρία.
5. Οι διαιτιτραίνοντες κλάδοι των μεσοπλεύριων αρτηριών και
6. Κλάδοι της υποπλάτιας αρτηρίας.

ii) Φλέβες

Ο μαστός διαθέτει ένα πλούσιο αναστομωτικό δίκτυο επιπολής φλεβών, οι οποίες εκβάλλουν κυρίως στην έσω μαστική φλέβα και εν συνεχεία στην ανώνυμο φλέβα. Οι εν τω βάθει φλέβες του μαστικού αδένου παρουσιάζουν παρόμοια κατανομή με τα αρτηριακά στελέχη. Η αποχέτευση του αίματος προς τις μεσοπλεύριες φλέβες και από εκεί στις σπονδυλικές και την άζυγο φλέβα δικαιολογεί τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων στη σπονδυλική στήλη.

iii) Λεμφαγγεία

Ο μαστός χαρακτηρίζεται από ένα πλούσιο δίκτυο λεμφαγγείων που αποχετεύει το δέρμα και τον αδενικό ιστό προς τα μασχαλαία και τα έσω μαστικά λεμφογάγγλια. Μεταξύ των δύο κυρίων οδών της λεμφικής αποχέτευσης υπάρχει πλήθος αναστομώσεων.

B. Λεμφαδένες του μαστού

α) Οι μασχαλιαίοι λεμφαδένες που δέχονται τη μεγαλύτερη ποσότητα της λέμφου από το μαστό και διακρίνονται σε έξι ομάδες:

i. Έξω μαστικοί (θωρακικοί ή έσω ομάδα) κατά μήκος της πλάγιας θωρακικής αρτηρίας.

ii. Ωμοπλατιαίοι (υποπλάτιοι ή οπίσθια ομάδα) κατά μήκος της υποπλάτιου φλέβας, πλησίον του θωρακοραχιαίου νεύρου.

iii. Κεντρικοί.

iv. Διαθωρακικοί (ή του Rotter) μεταξύ των δύο θωρακικών μυών.

v. Υποκλείδιοι (ή κορυφαίοι της μασχάλης) κάτω από τον τένοντα του υποκλείδιου μυός.

vi. Λεμφαδένες της μασχαλιαίας φλέβας (έξω ομάδα ή βραχιόνιοι) κάτω από τον τένοντα του μείζονος θωρακικού μυός.

Οι ανωτέρω λεμφαδένες ταξινομούνται επίσης και ανάλογα με τη σχέση τους ως προς τον ελάχιστο θωρακικό μυ σε τρία επίπεδα κατά Berg.

β) Οι λεμφαδένες της έσω μαστικής που δέχονται λέμφο από την οπίσθια και έσω επιφάνεια του μαστού, το διάφραγμα, το ήπαρ και την άνω μοίρα του ορθού κοιλιακού μυός. Εντοπίζονται στο ύψος των τριών πρώτων μεσοπλευρίων διαστημάτων.

γ) Οι υπερκλείδιοι λεμφαδένες που διηθούνται αφού πρώτα έχουν διηθηθεί τα υποκλείδια γάγγλια της υποκλειδιοσφαγιτιδικής γωνίας.¹³

2. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η ανάπτυξη του μαστού ξεκινά στην ήβη με την επίδραση των οιστρογόνων τα οποία προκαλούν αφενός την αύξηση του μαστικού αδένα και αφετέρου την εναπόθεση λίπους, οδηγώντας στην αύξηση του όγκου των μαστών. Κατά τη διάρκεια της κύησης τα υψηλά επίπεδα οιστρογόνων που παράγονται διεγείρουν την αύξηση και τη διακλάδωση των γαλακτοφόρων πόρων των μαστών αυξάνοντας παράλληλα τον όγκο τους. Επίσης παρατηρείται επιπλέον εναπόθεση λίπους. Τέσσερις ορμονών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των γαλακτοφόρων πόρων: η προλακτίνη, η αυξητική ορμόνη, η ινσουλίνη και τα γλυκοκορτικοειδή των επινεφριδίων. Η προγεστερόνη σε συνδυασμό κυρίως με τα οιστρογόνα αλλά και με άλλες ορμόνες προκαλεί την ανάπτυξη των εκκριτικών χαρακτηριστικών των κυψελών και την αύξηση των λοβιδίων. Η προλακτίνη είναι υπεύθυνη για την έκκριση του γάλακτος ενώ τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη για την αναστολή της¹⁴

3. ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ

Στο δεύτερο μήνα της κύησης εμφανίζονται οι γαλακτικές ακρολοφίες, ένα ζεύγος παχύνσεων του εξωδέρματος στην κοιλιακή επιφάνεια του εμβρύου που εκτείνονται από το άνω χείλος της μασχάλης έως τη βουβωνική χώρα και αποτελούν τον εν δυνάμει ιστό του μαστικού αδένα. Κατά τη δωδέκατη εβδομάδα της κύησης παραμένει μόνο το θωρακικό τμήμα των ακρολοφιών αυτών και εμφανίζονται 16-24 διεισδύσεις του επιθηλίου στο υποκείμενο μεσόδερμα. Αυτές θα σχηματίσουν τους μελλοντικούς γαλακτοφόρους πόρους και εν συνεχεία τους μαστούς.¹⁵

4. ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Ο μαστός αποτελείται κυρίως από αδενικό επιθήλιο, ινώδες στρώμα και λίπος. Από το δέρμα εκτείνονται προς την εν τω βάθει περιτονία στρώματα πυκνού συνδετικού ιστού (σύνδεσμος του Cooper), τα οποία είναι υπεύθυνα για το σχήμα του μαστού και την ανόρθωση του. Ο μαζικός αδένας αποτελείται από ένα διακλαδιζόμενο σύστημα πόρων οργανωμένο σε ακτινωτή μορφή. Οι υπό τη θηλή γαλακτοφόροι πόροι διατείνονται σχηματίζοντας τους γαλακτοφόρους κόλπους, οι οποίοι καταλήγουν στη θηλή μέσω 14-16 οπών. Τα αντίθετο άκρο των πόρων καταλήγει τυφλά στα λοβία, τα οποία μαζί με τους προσαγωγούς πόρους (ή σωληνάρια) ονομάζονται λοβίδια ή λοβιακές μονάδες. Το επιθήλιο των πόρων και των λοβιδίων αποτελείται από δύο στρώματα κυττάρων, τα κυβοειδή κύτταρα και τα κυλινδρικά κύτταρα που προβάλλουν προς τον αυλό. Το σύμπλεγμα πόρου-λοβιδίου περιβάλλεται από μυοεπιθηλιακά κύτταρα, τα οποία υπό την επίδραση της ωκυτοκίνης συσπώνται με στόχο την προώθηση του γάλακτος κατά τη διάρκεια του θηλασμού.¹⁶

5. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού γίνεται με βάση την προέλευση, το βαθμό διήθησης και την και τη μορφολογία του. Διακρίνουμε τους εξής ιστολογικούς τύπους:

A. In situ πορογενής καρκίνος (Ductal carcinoma in situ: DCIS)

Ο in situ πορογενής καρκίνος προέρχεται από τους τελικούς πόρους της λοβιακής μονάδας και παραμορφώνει τους πόρους αυξανόμενος σε μέγεθος. Τα νεοπλασματικά κύτταρα αναπτύσσονται εντός των πόρων χωρίς να διηθούν τη βασική τους μεμβράνη. Μπορεί να εμφανιστεί ως μάζα με ή χωρίς εκροή υγρού από τη θηλή. Συχνά εμφανίζεται με τη μορφή αποτιτανώσεων στις μαστογραφίες και θεωρείται ως αληθής πρόδρομη μορφή διηθητικού πορογενούς καρκινώματος. Διακρίνονται τρεις τύποι DCIS: ο φαγεσωρικός καρκίνος (comedo), ο θηλώδης και ο ηθμοειδής.

B. In situ λοβιακός καρκίνος (Lobular carcinoma in situ: LCIS)

Συνήθως πρόκειται για τυχαίο εύρημα σε βιοψία μαστού η οποία διενεργείται για τη διερεύνηση μιας τυχαίας μαστογραφικής βλάβης. Είναι συχνότερος σε προεμμηνόπαυσιες γυναίκες και η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 44 με 46 έτη. Χαρακτηρίζεται από πολυεστιακή εντόπιση σε ποσοστό 60%-85% και από αμφοτερόπλευρη εντόπιση σε ποσοστό 23%-69%. Μικροσκοπικά χαρακτηρίζεται από διάταξη των αδενοκυψέλων των λοβίων από χωρίς μεγάλη συνοχή ομοιόμορφα νεοπλασματικά κύτταρα και απουσία διήθησης της βασικής μεμβράνης. Συχνά υπάρχει υπερέκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων (ER), και απουσία έκφρασης του Her-2/neu. Τέλος LCIS αποτελεί δείκτη αυξημένου κινδύνου εμφάνισης διηθητικού καρκίνου (ιδίως IDC) σε αμφοτέρους τους μαστούς.

Γ. Διηθητικός πορογενής καρκίνος (IDC)

Αποτελεί το συνηθέστερο ιστολογικό τύπου του καρκίνου του μαστού (90%). Διακρίνεται σε διάφορους ιστολογικούς τύπους αλλά συνήθως πρόκειται για διηθητικό πορογενές καρκίνωμα χωρίς ιδιαίτερα χαρακτηριστικά (not otherwise

specified: NOS) με συχνότητα εμφάνισης 70% με 80%. Η διήθηση του στρώματος από νεοπλασματικά κύτταρα προκαλεί σημαντική δεσμοπλασία (ινοβλαστική υπερπλασία) και οδηγεί συνήθως στην εμφάνιση ψηλαφητής μάζας. Πολλές φορές αναφέρεται και ως σκιρρώδες καρκίνωμα και ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης διακρίνεται σε 3 βαθμούς κακοήθειας. Τα καρκινώματα αυτά έχουν συνήθως διάμετρο 2-5 εκ. και στη πλειοψηφία τους συνοδεύονται από λεμφαδενικές μεταστάσεις στη φάση διάγνωσης τους.

Δ. Διθητικός λοβιακός καρκίνος (ILC)

Ο διθητικός λοβιακός καρκίνος είναι υπεύθυνος για το 5% με 10% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Συχνά είναι πολυεστιακός ή αμφοτερόπλευρος και εμφανίζεται συνήθως ως ψηλαφητή μάζα ή ως μαστογραφική αλλοίωση. Μακροσκοπικά έχει σκληρή σύσταση και ασαφή όρια, ενώ μικροσκοπικά χαρακτηρίζεται από λεπτές χορδές νεοπλασματικών κυττάρων με λίγο κυτταρόπλασμα και βαθυχρωματικούς πυρήνες μέσα σε ινώδες υπόστρωμα. Ο κλασσικός λοβιακός καρκίνος εμφανίζει θετικούς οιστρογονικούς ή προγεστερονικούς υποδοχείς και απουσία έκφρασης του Her-2/neu. Άλλοι τύποι είναι ο συμπαγής, ο κυψελιδικός και το μικτός. Ο διθητικός λοβιακός καρκίνος εμφανίζει μεγαλύτερη τάση να μεθίσταται στο γαστρεντερικό σύστημα, στο περιτόναιο και στα αναπαραγωγικά όργανα, ενώ οι μεταστάσεις στους πνεύμονες, το ήπαρ και τον εγκέφαλο είναι λιγότερο συχνές, σε σχέση με το διθητικό πορογενή καρκίνο.^{17,18}

Ε. Άλλοι ιστολογικοί τύποι

Ο μυελοειδής καρκίνος αποτελεί ουσιαστικά τύπο του IDC με συχνότητα 3% και εκδηλώνεται ως μία μεγάλη περιγεγραμμένη και μαλθακή μάζα, η οποία στη μαστογραφία στερείται αποτιτανώσεων. Προσβάλλει συνήθως νεαρές γυναίκες με μεταλλάξεις του BRCA1. Μικροσκοπικά, χαρακτηρίζεται από κυτταρικές δεσμίδες με έντονη πλειομορφία και υψηλό μιτωτικό δείκτη. Συνήθως οι ορμονικοί υποδοχείς είναι αρνητικοί και η έκφραση του Her2/neu σπάνια. Οι λεμφαδενικές μεταστάσεις είναι σπανιότερες σε σχέση με τους υπόλοιπους τύπους και η πρόγνωση του καλύτερη. Άλλοι λιγότερο συχνόι τύποι διηθητικού πορογενή καρκίνου είναι ο σωληνώδης, ο θηλώδης, ο εκκριτικός κλπ.

Ο βλεννώδης ή κολλοειδής καρκίνος (2%) συναντάται συνήθως σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες της τρίτης ηλικίας. Ο όγκος απεικονίζεται ως μία καλώς περιγεγραμμένη μάζα στη μαστογραφία, ενώ κατά την κλινική εξέταση εμφανίζεται σαν μαλθακή μάζα σαφώς αφοριζόμενη από τους γύρω ιστούς. Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από συμπαγείς, θηλώδεις ή σωληνώδεις βλάστες που βρίσκονται μέσα σε βλέννη και διαχωρίζονται από διαφραγμάτια κολλαγόνου συνδετικού ιστού. Τα κύτταρα των καρκινωμάτων αυτών εμφανίζουν θετικούς ορμονικούς υποδοχείς, και απουσία έκφρασης για το Her2/neu. Θεωρείται καρκίνωμα με ευνοϊκή πρόγνωση και μικρά ποσοστά υποτροπών.

Ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού, εμφανίζεται με τα τοπικά σημεία της φλεγμονής και χαρακτηρίζεται από διάβρωση των δερματικών λεμφαγγείων και κακή πρόγνωση. Η νόσος Paget της θηλής συνήθως διαγιγνώσκεται λόγω μιας εκζεματοειδούς αλλοίωσης του δέρματος της θηλής και της θηλαίας άλου και συχνά σχετίζεται με την ύπαρξη υποκείμενου φαγεσωρικού DCIS. Μικροσκοπικά διακρίνονται ευμεγέθη κύτταρα με διαυγές κυτταρόπλασμα, τα οποία εντοπίζονται μεμονωμένα ή κατά ομάδες εντός της επιδερμίδας. Με τη βοήθεια της

ανοσοϊστοχημείας είναι δυνατόν να διακρίνουμε τη νόσο του Paget από το μελάνωμα.

19

6. ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Συνήθως οι καρκινικοί δείκτες είναι πρωτεϊνικά αντιγόνα που εγκαθίστανται στην κυτταρική μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων και χρησιμεύουν κυρίως στον έλεγχο της ανταπόκρισης της νόσου στη χημειοθεραπεία καθώς επίσης και στη μετεγχειρητική παρακολούθηση των ασθενών. Δείκτες οι οποίοι καθορίζουν την πρόγνωση, αλλά και τη θεραπεία που θα λάβει η ασθενής είναι η παρουσία οιστρογονικών (ER) και προγεστερονικών υποδοχέων (PR), καθώς και η έκφραση του HER2. Τα αντιγόνα CA 15-3, CA 27.29 και CEA έχουν θέση στην παρακολούθηση ασθενών με μεταστατική νόσο και ενεργό θεραπεία, σε συνδυασμό πάντα με τη κλινική εξέταση και τις απεικονιστικές μεθόδους.²⁰

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί στον αναπτυγμένο κόσμο τη συχνότερη κακοήθεια και το δεύτερο πιο συχνό αίτιο θανάτου στο γυναικείο φύλο, μετά το καρκίνου του πνεύμονα. Στους άνδρες ο καρκίνος του μαστού είναι πιο σπάνιος άλλα και πιο επιθετικός. Στις Η.Π.Α. διαγιγνώσκονται 527 νέα κρούσματα καρκίνου του μαστού σε γυναίκες και καταγράφονται 125 θάνατοι από τη συγκεκριμένη νόσο ημερησίως. Στις χώρες του Δυτικού κόσμου υπολογίζεται ότι μία στις 8 γυναίκες θα εμφανίσει καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής της, ενώ στην χώρα μας καταγράφονται 4.000 - 4.500 νέες περιπτώσεις περίπου κάθε χρόνο.²¹

2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.^{22,23}

Παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού
Λευκή φυλή
Ηλικία >40
Ηλικία εμμηναρχής <11 ετών
Ηλικία εμμηνόπαυσης >55 ετών
Ατοκία
Ηλικία της πρώτης εγκυμοσύνης >30 ετών
Παρατεταμένη θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα
Παρατεταμένη χρήση αντισυλληπτικών δισκίων πριν την πρώτη εγκυμοσύνη
Μεταλλαγμένα γονίδια, όπως BRCA1, BRCA2, p53 και PTEN
Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή των ωοθηκών
Απουσία ιστορικού θηλασμού
Λήψη ορμονικών σκευασμάτων για τη γονιμότητα ή διαιθυλστυλβεστρόλης
Ιονίζουσα ακτινοβολία

3. ΠΡΟΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ως γνωστόν ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού είναι η πρόληψη. Ο προσυμπτωματικός έλεγχος δίνει έγκαιρη διάγνωση και περιλαμβάνει την αυτοεξέταση του μαστού με την ψηλάφηση, την κλινική εξέταση από τον ιατρό και τέλος τη μαστογραφία. Η ACS (American Cancer Society) συστήνει η κλινική εξέταση του μαστού από ειδικό να ξεκινάει στην ηλικία των 20 ετών και να επαναλαμβάνεται τουλάχιστον κάθε 3 χρόνια μέχρι την ηλικία των 40. Ο δε τακτικότερος μαστογραφικός έλεγχος θα πρέπει να ξεκινάει στην ηλικία των 40 ετών και να επαναλαμβάνεται μια φορά το χρόνο, εφόσον η γυναίκα είναι σε άριστη κατάσταση ενώ η εξέταση θα πρέπει να γίνεται από εξειδικευμένο ιατρό. Η αυτοεξέταση του μαστού προτείνεται να αρχίζει στην ηλικία των 20 ετών καθώς οι γυναίκες που υποβάλλονταν σε τακτική αυτοεξέταση του μαστού φαίνεται ότι παρουσίασαν μικρότερους όγκους κατά τη διάγνωση, μικρότερη πιθανότητα να εμφανίσουν μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες και καλύτερη πρόγνωση. Επιπλέον, το ποσοστό συμμετοχής των μασχαλιαίων λεμφαδένων στη νόσο αλλά και το μέγεθος του όγκου ήταν μικρότερα στις ασθενείς που πραγματοποιούσαν τη διαδικασία της αυτοεξέτασης μια φορά το μήνα και παράλληλα εξετάζονταν μια φορά το χρόνο από τον κλινικό ιατρό. Σε μία μετα-ανάλυση 5 σουηδικών μελετών, φαίνεται το όφελος της μαστογραφίας στον προσυμπτωματικό έλεγχο καθώς η θνητότητα παρουσίασαν μια σημαντικά στατιστική μείωση της τάξης του 24% μέσα σε 12 χρόνια (ηλικίες μεταξύ 40 και 70 έτη).²⁴

4. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Το συχνότερο σύμπτωμα του καρκίνου του μαστού είναι η εύρεση μιας ψηλαφητής μάζας (77%), η οποία τις περισσότερες φορές είναι σκληρή, ανώδυνη, στερεά και συμφυώμενη στους τριγύρω ιστούς. Η έκκριση στη θηλή αποτελεί το δεύτερο σε συχνότητα κλινικό εύρημα της νόσου (13%). Πόνος υφίσταται συνήθως σε προχωρημένο στάδιο της νόσου και δεν αποτελεί την πρώτη εκδήλωση της. Η έλξη του δέρματος και η εισολκή της θηλής μπορεί να προκαλούνται από την βράχυνση των συνδέσμων του Cooper, εξαιτίας της διήθησής τους από τον όγκο. Μεταξύ άλλων δερματικών αλλαγών περιλαμβάνονται η ερυθρότητα, το οίδημα του δέρματος υπό μορφή φλοιού πορτοκαλιού (peau d' orange), όπως επίσης και η πάχυνση του. Σε προχωρημένα στάδια, ίσως παρατηρηθεί αιμορραγία, εξέλκωση, διόγκωση των μασχαλιαίων λεμφαδένων και οστικά άλγη λόγω των μεταστάσεων.²⁵

5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση περιλαμβάνει τη λήψη ιστορικού, την κλινική εξέταση, τον απεικονιστικό έλεγχο και τη λήψη βιοψιών. Η προσεκτική λήψη του ιστορικού είναι πολύ σημαντική. Κατά τη διάρκεια της λαμβάνονται πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά της βλάβης, όπως η διάρκεια εμφάνισής της, η εντόπιση και η σχέση της με τον εμμηνορρυσιακό κύκλο και η ασθενής ερωτάται για την παρουσία εκκρίματος της θηλής και τα χαρακτηριστικά του, όπως η ποσότητα, το χρώμα, εάν η έκκριση είναι αυτόματη ή μετά από άσκηση πίεσης στη θηλή, εάν είναι αμφοτερόπλευρη κλπ. Τέλος, αναγνωρίζεται η ύπαρξη παραγόντων κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού και τα δεδομένα αυτά θα συνεκτιμηθούν με τον

υπόλοιπο απεικονιστικό και κλινικοεργαστηριακό έλεγχο για να συσταθεί στην ασθενή η κατάλληλη αντιμετώπιση.

Το επόμενο στάδιο είναι η κλινική εξέταση του μαστού που περιλαμβάνει την επισκόπηση και κυρίως τη ψηλάφηση. Οι μαστοί επισκοπούνται ως προς τη συμμετρία τους, την ύπαρξη εκζέματος ή διαβρώσεων, την ύπαρξη εισολκής της θηλής ή εκροής υγρού από αυτή και την παρουσία οιδήματος και ερυθρότητας του δέρματος (peau d' orange). Η ιδανική περίοδος για την εξέταση των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών είναι κατά τη δεύτερη εβδομάδα του κύκλου τους διότι οι ορμονικές επιδράσεις στους μαστούς είναι ηπιότερες. Με την ψηλάφηση αποκαλύπτονται τα χαρακτηριστικά της ύποπτης ψηλαφητής μάζας, όπως το μέγεθος, η κινητικότητα, η σύσταση, το σχήμα, τα όρια, η σχέση με τις παρακείμενες δομές και η ύπαρξη ευαισθησίας. Επιπλέον γίνεται προσπάθεια έκκρισης υγρού από τη θηλή με άσκηση πίεσης περίξ αυτής. Τέλος, ψηλαφώνται οι μασχαλιαίοι, οι υποκλείδιοι και οι υπερκλείδιοι λεμφαδένες.²⁶

Το υπερηχοτομογράφημα μαστών αποτελεί βασική εξέταση για την ανάδειξη βλαβών του μαστού. Με τη χρήση των υπερήχων μπορεί εύκολα να γίνει διαφοροδιάγνωση ανάμεσα στις κυστικές και στις συμπαγείς βλάβες και να εκτιμηθεί καλύτερα μια ψηλαφητή μάζα σε έναν νεανικό και ακτινολογικά πυκνό μαστό. Επίσης εφαρμόζεται για την εκτίμηση μη ψηλαφητών μαζών, με ασαφή μαστογραφική απεικόνιση και για τον καθορισμό βλαβών, οι οποίες λόγω θέσης δε δύναται να αναδειχθούν με τη μαστογραφία. Άλλες ενδείξεις για το υπερηχογράφημα μαστών είναι η εξέταση ενός φλεγμονώδη μαστού για την παρουσία αποστήματος, η εξέταση μίας ψηλαφητής μάζας σε γυναίκα κάτω των 30 ετών και η εφαρμογή επεμβατικών διαδικασιών υπό τη καθοδήγησή του, όπως η κατευθυνόμενη παρακέντηση κύστεων, η κατευθυνόμενη βιοψία και η τοποθέτηση οδηγού σύρματος (hook) σε μια βλάβη.

Η μαστογραφία αποτελεί βασική εξέταση στα πλαίσια του προσυμπτωματικού ελέγχου αλλά και ένα πολύ χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο για τη διερεύνηση των παθήσεων του μαστού. Διαγνωστική μαστογραφία πρέπει να διενεργείται σε γυναίκες μεγαλύτερες των 30 ετών, στις οποίες η κλινική εξέταση ανέδειξε μία ύποπτη αλλοίωση. Δυστυχώς το 10% με 15% των καρκίνων του μαστού δε ανιχνεύονται με τη μαστογραφία και αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται πάντα υπ' όψιν. Η παρουσία καρκίνου είναι πολύ πιθανή όταν η μάζα εμφανίζεται με ακτινωτή διαμόρφωση, ασαφή όρια και υπάρχουν ύποπτες μικροαποτιτανώσεις. Η συχνότητα διάγνωσης καρκίνου του μαστού από βλάβες που είχαν εντοπιστεί αρχικά με μαστογραφία κυμαίνεται από 15% μέχρι 35%.

Η μαγνητική μαστογραφία ενδείκνυται κυρίως για την εκτίμηση ψηλαφητών όγκων με αρνητική μαστογραφία και αρνητικό υπερηχογράφημα, για την προεγχειρητική εκτίμηση του ασθενούς επί πολυεστιακού καρκινώματος και για τη μετεγχειρητική παρακολούθηση των ασθενών. Επίσης επί ύπαρξης θετικών μασχαλαίων λεμφαδένων με αρνητική μαστογραφία ενδείκνυται για τον εντοπισμό της πρωτοπαθούς εστίας. Άλλες ενδείξεις είναι η υποψία λοβιακού καρκίνου και η παρουσία πυκνού αδενικού ιστού στη μαστογραφία. Λόγω του υψηλού κόστους δε χρησιμοποιείται συχνά.

Η ακτινογραφία θώρακος, η αξονική τομογραφία εγκεφάλου, θώρακος και άνω-κάτω κοιλίας καθώς και το σπινθηρογράφημα οστών γίνονται κυρίως για την σταδιοποίηση ασθενών. Η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων και η γαλακτογραφία χρησιμοποιούνται σπανιότερα.²⁷

Εν συνεχεία, οι ιστολογικές και κυτταρολογικές εξετάσεις θα επιβεβαιώσουν την διάγνωση. Η αναρρόφηση δια λεπτής βελόνης (Fine-Needle Aspiration: FNA) γίνεται με βελόνη 20-22 G και παρέχει πληροφορίες για το αν η βλάβη είναι κυστική ή

συμπαγής ενώ ταυτόχρονα συλλέγει κυτταρολογικό δείγμα από την ύποπτη περιοχή. Πρόκειται για μια επεμβατική, γρήγορη και ελάχιστα επώδυνη διαγνωστική μέθοδο. Ο κίνδυνος εμφάνισης επιπλοκών, όπως επιμολύνσεις, εκχυμώσεις, αιματώματα, και σπάνια πνευμοθώρακας είναι μικρός.

Η κυτταρολογική εξέταση του υγρού παρακέντησης μιας βλάβης ή του εκκρίματος της θηλής μας δίνει πληροφορίες για την ύπαρξη καρκινικών κυττάρων. Οι κύστες με αιμορραγικό υγρό πρέπει να αφαιρούνται διότι ο κίνδυνος συνύπαρξης κακοήθειας είναι αυξημένος και αγγίζει το 15%. Το ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων είναι υψηλό και κυμαίνεται από 16,4% έως 45%, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η διαγνωστική της αξία. Επιπλέον, ένα άλλο μειονέκτημα της κυτταρολογικής εξέτασης είναι ότι δε διακρίνει τον *in situ* από το διηθητικό καρκίνο και δεν παρέχει ιστολογικά στοιχεία ώστε να καθοριστεί το είδος της επέμβασης.²⁸

Η βιοψία δια βελόνης (core biopsy) γίνεται υπό τοπική αναισθησία και με τη χρήση ειδικών συσκευών, όπως οι tru-cut βελόνες και ο μαμοτόμος λαμβάνοντας πολλαπλά κυλινδρικά ιστοτεμάχια από την υπό εξέταση βλάβη. Αποτελεί μια γρήγορη, ελάχιστα επεμβατική και φθηνή διαγνωστική μέθοδο που μπορεί να διενεργηθεί υπό υπερηχογραφική ή μαστογραφική καθοδήγηση. Η εμφάνιση επιπλοκών είναι σπάνια και οι συχνότερες περιλαμβάνουν την εμφάνιση αιματώματος, την επιμόλυνση της περιοχής και την πρόκληση πνευμοθώρακα. Οι βιοψίες αυτές θα πρέπει να γίνονται από εξειδικευμένο προσωπικό με ειδικά εργαλεία έτσι ώστε να μειώνεται ο κίνδυνος διασποράς καρκινικών κυττάρων αλλά και για να ελαττωθεί το ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.

Η ανοικτή βιοψία υπό τοπική ή γενική αναισθησία όταν έχουν αποτύχει οι προηγούμενες μέθοδοι αποτελεί την πιο αξιόπιστη μέθοδο διάγνωσης μιας μαστικής

βλάβης. Μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η μετεγχειρητική ουλή και το υψηλό κόστος.

Η βιοψία του φρουρού λεμφαδένα συνίσταται στη ιστολογική εξέταση του πρώτου μασχαλιαίου λεμφαδένα που δέχεται τη λέμφο από το μαστό. Μετά από την ένεση ραδιοϊσοτοπικής ή χρωστικής ουσίας στο δέρμα πάνω από τη μάζα και κοντά στη θηλή, γίνεται απαγωγή του φαρμάκου από το λεμφαδενικό δίκτυο του μαστού προς τη μασχαλιαία χώρα. Ύστερα από την πάροδο μερικών λεπτών εντοπίζεται μετά από διατομή του υπερκείμενου δέρματος και υπό άμεση όραση ή με τη χρήση μετρητή Geiger ο λεμφαδένας φρουρός.^{29,30}

6. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια ο καρκίνος του μαστού έχει υποβληθεί σε πολλές αναθεωρήσεις όσον αφορά το σύστημα σταδιοποίησης του, λόγω της προόδου της τεχνολογίας, αλλά κυρίως λόγω της καλύτερης κατανόησης της παθογένειας της νόσου. Το 2006 επεξεργάστηκε για τελευταία φορά από την AJCC (American Joint Committee on Cancer) το σύστημα που χρησιμοποιείται σήμερα. Είναι ένα παθολογικό και κλινικό σύστημα, βασιζόμενο στην ταξινόμηση κατά TNM (Tumor, Node, Metastasis). Το σύστημα αυτό λαμβάνει υπ' όψιν την κατάσταση του φρουρού λεμφαδένα, τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις και τις μικρομεταστάσεις. Ως κλινικά εμφανείς, ορίζονται οι λεμφαδένες που ανευρίσκονται μετά από απεικονιστικό έλεγχο ή κατά την κλινική εξέταση, ή είναι μακροσκοπικά παθολογικοί. Ως μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα (**Isolated Tumor Cells**) ορίζονται μονήρη καρκινικά κύτταρα ή μικρές κυτταρικές συσσωρεύσεις <2 χιλ., οι οποίες ανευρίσκονται συνήθως με ανοσοϊστοχημικές (IHC) ή μοριακές μεθόδους (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. RT-PCR)¹⁸

α. Πρωτοπαθής όγκος (T)

TX		Ο πρωτοπαθής όγκος δε μπορεί να εκτιμηθεί
T0		Μη ανιχνεύσιμος πρωτοπαθής όγκος
Tis		Λοβιακό (LCIS) ή Πορογενές (DCIS) καρκίνωμα in situ ή νόσος Paget της θηλής χωρίς ψηλαφητή διόγκωση
T1		Όγκος μέγιστης διαμέτρου <2 εκ.
	T1mic	Μικροδιήθηση μέγιστης διαμέτρου < 0,1 εκ.
	T1a	Όγκος μέγιστης διαμέτρου >0,1 εκ. και <0,5 εκ.
	T1b	Όγκος μέγιστης διαμέτρου >0,5 εκ. και <1 εκ.
	T1c	Όγκος μέγιστης διαμέτρου >1 εκ. και <2 εκ.
T2		Όγκος μέγιστης διαμέτρου >2 εκ. και <5 εκ.
T3		Όγκος μέγιστης διαμέτρου >5 εκ.
T4		Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα ή/και το δέρμα
	T4a	Επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα, χωρίς συμμετοχή του μείζονος θωρακικού μυός
	T4b	Οίδημα (περιλαμβανομένου και του peau d' orange) ή εξέλκωση του δέρματος του μαστού ή δορυφόρα δερματικά οζίδια στον ίδιο μαστό
	T4c	T4a και T4b
	T4d	Φλεγμονώδης καρκίνος

β. Επιχώριοι λεμφαδένες (N)

Nx		Οι επιχώριοι λεμφαδένες δε μπορούν να εκτιμηθούν
N0		Δεν ανευρίσκονται μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες.
	N0(I)	Δεν ανευρίσκονται μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες, αρνητική IHC
	N0(I+)	Δεν ανευρίσκονται ιστολογικώς μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες, θετική IHC
	N0(mol-)	Δεν ανευρίσκονται ιστολογικώς μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες, αρνητικά ευρήματα στο μοριακό έλεγχο (RT-PCR)
	N0(mol+)	Δεν ανευρίσκονται ιστολογικώς μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες, θετικά ευρήματα στο μοριακό έλεγχο (RT-PCR)
N1		Μεταστάσεις σε 1 έως 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες και/ή έσω μαστικοί λεμφαδένες με μικροσκοπική νόσο που ανευρίσκεται μετά από παρασκευή του φρουρού λεμφαδένα, χωρίς όμως να είναι κλινικά εμφανής
	N1mi	Μικρομετάσταση >0,2 χιλ. και <2 χιλ.
	N1a	Μεταστάσεις σε 1 έως 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες
	N1b	Μεταστάσεις στους έσω μαστικούς λεμφαδένες με μικροσκοπική νόσο, που ανευρίσκεται μετά από παρασκευή του φρουρού λεμφαδένα, χωρίς όμως να είναι κλινικά εμφανείς
	N1c	Μεταστάσεις σε 1 έως 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες και έσω μαστικοί λεμφαδένες με μικροσκοπική νόσο που ανευρίσκεται μετά από παρασκευή του φρουρού λεμφαδένα, χωρίς όμως να είναι κλινικά εμφανείς
N2		Μεταστάσεις σε 4 έως 9 μασχαλιαίους λεμφαδένες, ή σε κλινικά εμφανείς έσω μαστικούς λεμφαδένες επί απουσίας μασχαλιαίων λεμφαδενικών μεταστάσεων
	N2a	Μεταστάσεις σε 4 έως 9 μασχαλιαίους λεμφαδένες
	N2b	Μεταστάσεις σε κλινικά εμφανείς έσω μαστικούς λεμφαδένες επί απουσίας μασχαλιαίων λεμφαδενικών μεταστάσεων
N3		Μεταστάσεις σε τουλάχιστον 10 μασχαλιαίους λεμφαδένες ή σε υποκλείδιους λεμφαδένες, ή στους κλινικά εμφανείς σύστοιχους έσω μαστικούς λεμφαδένες με παρουσία 1 έως 4 θετικών μασχαλιαίων λεμφαδένων ή στους σύστοιχους υπερκλείδιους λεμφαδένες
	N3a	Μεταστάσεις σε τουλάχιστον 10 μασχαλιαίους λεμφαδένες ή μεταστάσεις στους υποκλείδιους λεμφαδένες
	N3b	Μεταστάσεις στους κλινικά εμφανείς σύστοιχους έσω μαστικούς λεμφαδένες επί παρουσίας ενός ή περισσότερων θετικών μασχαλιαίων λεμφαδένων ή μεταστάσεις σε περισσότερους από 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες και σε έσω μαστικούς λεμφαδένες με μικροσκοπική νόσο που ανευρίσκονται με την παρασκευή του φρουρού λεμφαδένα, χωρίς όμως να είναι κλινικά εμφανείς
	N3c	Μεταστάσεις στους σύστοιχους υπερκλείδιους λεμφαδένες

γ. Απομακρυσμένες Μεταστάσεις (M)

Mx	Οι απομακρυσμένες μεταστάσεις δεν μπορούν να εκτιμηθούν
M0	Δεν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1	Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

δ. Σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού κατά το σύστημα TNM (AJCC)

Στάδιο 0	Tis, N0, M0
Στάδιο I	T1, N0, M0
Στάδιο IIA	T0, N1, M0
	T1, N1, M0
	T2, N0, M0
Στάδιο IIB	T2, N1, M0
	T3, N0, M0
Στάδιο IIIA	T0, N2, M0
	T1, N2, M0
	T2, N2, M0
	T3, N1, M0
	T3, N2, M0
Στάδιο IIIB	T4, οποιοδήποτε N, M0
Στάδιο IIIC	Οποιοδήποτε T, N3, M0
Στάδιο IV	Οποιοδήποτε T, οποιοδήποτε N, M1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

1.ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει εξέλιξη στην θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού και γίνονται προσπάθειες για την καθιέρωση ελάχιστα τεχνικών και λιγότερο ριζικών επεμβάσεων. Επιπλέον με τη διατήρηση του μαστού αποφεύγεται ο ψυχικός τραυματισμός των γυναικών με καρκίνο πρώιμου σταδίου ενώ επιτυγχάνεται και καλύτερο κοσμητικό αποτέλεσμα. Η αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού περιλαμβάνει τη χειρουργική θεραπεία, την ακτινοθεραπεία, τη χημειοθεραπεία, την ορμονοθεραπεία και τις νεότερες στοχευμένες θεραπείες.³¹

2. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η χειρουργική θεραπεία αποτελεί τον κυριότερο τρόπο αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού σταδίου I και II. Μεγάλες τυχαιοποιημένες προοπτικές μελέτες έδειξαν ότι οι συντηρητικές επεμβάσεις σε συνδυασμό με τη μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία, έχουν εξίσου καλά αποτελέσματα με την τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή όσον αφορά την επιβίωση ελεύθερης νόσου και τη συνολική επιβίωση. Σήμερα ενδείξεις συντηρητικών χειρουργικών επεμβάσεων αποτελούν τα στάδια I και II όταν ο όγκος είναι <4 εκ, η καλή διαφοροποίηση, ο μονήρης όγκος, η δυνατότητα επίτευξης αρνητικών ορίων εκτομής με ταυτόχρονο καλό αισθητικό αποτέλεσμα, οι ασθενείς νεαρής ηλικίας (σχετική ένδειξη) και η προτίμηση της ασθενούς. Στο στάδιο III οι

όγκοι αντιμετωπίζονται χειρουργικά, εφόσον συνήθως έχει προηγηθεί προεγχειρητική χημειοθεραπεία, με σκοπό να υποσταδιοποιηθεί ο όγκος ώστε να μπορεί να εξαιρεθεί με ασφάλεια και αρνητικά όρια εκτομής. Στη περίπτωση που ο όγκος δεν ανταποκριθεί στην χημειοθεραπεία, θεωρείται ανεγχείρητος και ακολουθούν συνεδρίες ακτινοβολίας. Σε όγκους σταδίου IV, η χειρουργική θεραπεία αποσκοπεί μόνο στην αντιμετώπιση και τον περιορισμό των τοπικών επιπλοκών (εγχείρηση «τουαλέτας»)^{32,33}.

3. ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Όσες γυναίκες έχουν υποβληθεί σε συντηρητικές χειρουργικές επεμβάσεις διατήρησης του μαστού θα πρέπει να υποβάλλονται μετεγχειρητικά σε ακτινοθεραπεία. Έρευνες έχουν αποδείξει πως τα ποσοστά εμφάνισης τοπικών υποτροπών μειώνονται με την ακτινοθεραπεία από 26% σε 7%. Η ακτινοθεραπεία συνήθως διαρκεί 5-6 εβδομάδες και η δόση ακτινοβολίας σε αυτό το διάστημα είναι συνολικά 5000 cGy. Με αυτό το σχήμα ακτινοθεραπείας, τα ποσοστά της ελεύθερης νόσου επιβίωσης καθώς και της συνολικής επιβίωσης μετά από 20ετή παρακολούθηση, ήταν παρόμοια με αυτά της μαστεκτομής. Σήμερα γίνονται προσπάθειες για την καθιέρωση θεραπευτικών σχημάτων μικρότερης διάρκειας τα οποία παρουσιάζουν εξίσου καλά αποτελέσματα. Έτσι, μειώνεται το κόστος της θεραπείας καθώς μειώνεται ο αριθμός των επισκέψεων στον ακτινοθεραπευτή. Οι ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μαστεκτομή και παρουσιάζουν μεταστατική νόσο στη μασχαλιαία κοιλότητα, εμφανίζουν βελτιωμένα ποσοστά επιβίωσης μετά από μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία. Έχει αποδειχθεί ότι η ακτινοθεραπεία μετά από μαστεκτομή είναι ωφέλιμη όταν τα χειρουργικά όρια είναι θετικά, όταν ο όγκος είναι

T3 ή T4 και όταν υπάρχουν περισσότεροι από 4 θετικοί λεμφαδένες. Η έρευνα στον τομέα της ακτινοθεραπείας επικεντρώνεται στην ανάδειξη νέων τεχνικών με μικρότερη τοξικότητα, αλλά και με πιο άμεσα αποτελέσματα, όπως η τρισδιάστατη ακτινοθεραπεία, η βραχυθεραπεία και η διεγχειρητική ακτινοθεραπεία.³⁴⁻³⁶

4. ΟΡΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η έκφραση στεροειδικών ορμονικών υποδοχέων (ER και/ή PR) στα καρκινικά κύτταρα του μαστού αποτελεί το πρώτο βιολογικό διαχωρισμό και καθορίζει την περαιτέρω θεραπεία. Σχεδόν το 70% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού έχουν θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς των οποίων η συχνότητα έκφρασης αυξάνει με την ηλικία. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η λήψη ταμοξιφαίνης για πέντε έτη μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης υποτροπών κατά 40% και τη θνητότητα κατά 30%. Η ταμοξιφαίνη παραμένει το συχνότερα χρησιμοποιούμενο αντιοιστρογονικό ορμονοθεραπευτικό φάρμακο. Η ταμοξιφαίνη αποτελεί την ορμονική θεραπεία πρώτης γραμμής με δόση 20 mg/ημέρα στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Παρενέργειες της ταμοξιφαίνης μεταξύ άλλων είναι θρομβοεμβολικά επεισόδια, κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου, έμφραγμα του μυοκαρδίου και αγγειοκινητικές διαταραχές. Ανάλογα της LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone), όπως η γκοσερελίνη ή της GnRH (gonadotropin-releasing hormone) μπορεί να χρησιμοποιηθούν μόνα τους ή σε συνδυασμό με ταμοξιφαίνη. Η καταστολή των ωοθηκών ή ωοθηκεκτομή με ακτινοβολήση εφαρμόζονται πλέον σπάνια.

Οι αναστολείς της αρωματάσης εμποδίζουν τη δράση του ενζύμου, με αποτέλεσμα τα επίπεδα των οιστρογόνων στη συστηματική κυκλοφορία να είναι χαμηλά. Η χρήση

των αναστολέων της αρωματάσης στις μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς, παρουσιάζει μια ωφέλιμη, σχετική βελτίωση του ελεύθερου νόσου διαστήματος της τάξης του 13-40%. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι αναστολείς της αρωματάσης είναι ανώτεροι της ταμοξιφαίνης, ανεξαρτήτως από το αν αυτοί χορηγηθούν σε δεύτερο χρόνο (ταμοξιφαίνη για 2-3 έτη και στη συνέχεια αναστολείς αρωματάσης για 2-3 έτη) ή άμεσα (αντί για ταμοξιφαίνη για 5 έτη). Οι κυριότερες παρενέργειες των φαρμάκων είναι η εμφάνιση καταγμάτων, η οστική ατροφία και οι αρθραλγίες. Οι ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με αναστολείς της αρωματάσης, κατά την έναρξη της θεραπείας θα πρέπει να υποβάλλονται σε μέτρηση της οστικής πυκνότητας. Εφόσον η οστική πυκνότητα είναι φυσιολογική, ο κίνδυνος ανάπτυξης οστεοπόρωσης είναι μικρός και δε χρειάζεται περαιτέρω παρακολούθηση. Σε αντίθετη περίπτωση, οι ασθενείς που παρουσιάζουν παθολογική οστική πυκνότητα θα πρέπει να λάβουν συμπληρώματα ασβεστίου και βιταμίνης D, καθώς και διφωσφονικών, ώστε να διατηρήσουν μια ικανοποιητική οστική πυκνότητα. Η χορήγηση αναστολέων της αρωματάσης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που είχαν λάβει ταμοξιφαίνη για 5 έτη, φαίνεται ότι ελαττώνει τα ποσοστά εμφάνισης υποτροπών κατά 40% σε σύγκριση με τις ασθενείς που έλαβαν placebo, ενώ βελτιώνεται η επιβίωση των ασθενών με θετικούς λεμφαδένες. Η μελέτη ATLAS έδειξε πρόσφατα ότι η 10ετής χορήγηση ταμοξιφαίνης έχει καλύτερα αποτελέσματα από την 5ετή.³⁷⁻³⁹

5. ΠΡΟΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η προεγχειρητική χορήγηση χημειοθεραπείας/ορμονοθεραπείας (neoadjuvant therapy) χρησιμοποιείται για την υποσταδιοποίηση της νόσου και την υποστρόφη των μεγάλων όγκων. Η χειρουργική αντιμετώπιση, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει τη

ρίζικη τροποποιημένη μαστεκτομή ή να περιορίζεται σε μια συντηρητική εκτομή, ακολουθείται πάντα από λεμφαδενικό καθαρισμό της μασχάλης. Σε παρασκευάσματα μαστεκτομής ασθενών που υπεβλήθησαν σε προεγχειρητική χημειοθεραπεία, ανευρέθη πλήρης ανταπόκριση του όγκου στη θεραπεία και υποστρόφη σε ποσοστό 3%-18%. Ορμονοθεραπεία, χημειοθεραπεία και σε ορισμένες περιπτώσεις και ακτινοθεραπεία (T3 και T4) είναι δυνατόν να ακολουθήσει μετεγχειρητικά.⁴⁰

6. ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Αναπόσπαστο κομμάτι της θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού, αποτελεί η επικουρική χημειοθεραπεία. Ο καρκίνος του μαστού είναι χημειοευαίσθητος με καλή ανταπόκριση στη μετεγχειρητική χημειοθεραπεία. Οι κυριότερες ενδείξεις χορήγησης επικουρικής χημειοθεραπείας στον καρκίνο του μαστού είναι η λεμφαγγειακή διήθηση, η παρουσία θετικών μασχαλιαίων λεμφαδένων, ο βαθμός κακοήθειας III, το μέγεθος όγκου > 2 εκ. και η παρουσία αρνητικών οιστρογονικών υποδοχέων. Βάση των περισσότερων χημειοθεραπευτικών σχημάτων είναι η ανθρακυκλίνη (δοξορουμπικίνη ή επιρουμπικίνη), η εφαρμογή της οποίας επέφερε μείωση της θνητότητας κατά 20% για τις γυναίκες ηλικίας 50-69 έτη και 38% για τις γυναίκες ηλικίας μικρότερης των 50 ετών. Τα συχνότερα χημειοθεραπευτικά σχήματα αποτελούνται από: 5-φθοριουρακίλη ($600 \text{ mg/m}^2 \times 1$), επιρουμπικίνη ($75 \text{ mg/m}^2 \times 1$) και κυκλοφωσφαμίδη ($600 \text{ mg/m}^2 \times 1$) ανά 3 εβδομάδες για 6 κύκλους ή αδριαμυκίνη ($60 \text{ mg/m}^2 \times 1$) και κυκλοφωσφαμίδη ($600 \text{ mg/m}^2 \times 1$) ανά 3 εβδομάδες για 4-6 κύκλους. Η προσθήκη των ταξανών στα

ανωτέρω σχήματα μειώνει τη θνητότητα επιπλέον κατά 15%. Οι ταξάνες δρουν στην τουμπουλίνη του κυττάρου, τη σταθεροποιούν και αυξάνουν τον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις G2 και M.⁴¹

Το μεγάλο μειονέκτημα των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων είναι η εμφάνιση αρκετών τοξικών παρενεργειών. Οι συχνότερες από αυτές είναι η παρουσία ναυτίας, αδυναμίας, λευκοπενίας, αμηνόρροιας νευρικότητας και θρομβοκυτοπενίας. Λιγότερο συχνές παρενέργειες είναι η επιπεφυκίτιδα, οι έμετοι, η κυστίτιδα, τα μυοσκελετικά άλγη, η εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, η καρδιακή δυσλειτουργία και η αλωπεκία. Η εφαρμογή μοριακών προγνωστικών δεικτών για την εξατομίκευση των θεραπευτικών σχημάτων ανάλογα με τον υπότυπο του όγκου και το γονιδιακό προφίλ του ασθενή, έτσι ώστε να υποβάλλονται στην κατάλληλη θεραπεία μόνο εκείνοι οι ασθενείς που έχουν αυξημένες πιθανότητες να ωφεληθούν από αυτήν αποτελεί πρόκληση για την επικουρική χημειοθεραπεία του καρκίνου μαστού του μέλλοντος.⁴²

7. ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Το ένα τέταρτο σχεδόν των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού εκφράζει το ογκογονίδιο HER2. Το ογκογονίδιο αυτό καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη βιολογική συμπεριφορά των όγκων αυτών, αφού ευθύνεται για τη σύνθεση της μεμβρανικής πρωτεΐνης HER2 που συμμετέχει στις διαδικασίες αύξησης του κυττάρου. Η αποστολή σημάτων από τη μεμβρανική πρωτεΐνη HER2 στον πυρήνα εμποδίζεται από το μονοκλωνικό αντίσωμα **Trastuzumab (Herceptin)** που συνήθως χορηγείται για 12 μήνες και ο κίνδυνος εμφάνισης υποτροπής μειώνεται επιπλέον κατά 35-52% συγκρινόμενος με τα αποτελέσματα που επιτυγχάνονται με την ορμονοθεραπεία και

την χημειοθεραπεία. Η σοβαρότερη παρενέργεια του φαρμάκου είναι η εμφάνιση καρδιακής δυσλειτουργίας, η οποία υποχωρεί με τη διακοπή του φαρμάκου, και η καρδιοτοξικότητα.⁴³

8. ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΕ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗ Η ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟ

Έχει παρουσιαστεί τις τελευταίες δεκαετίες σημαντική βελτίωση στην επιβίωση των ασθενών με μεταστατική νόσο, εξαιτίας της προόδου των θεραπευτικών σχημάτων. Με τα νέα χημειοθεραπευτικά φάρμακα σε συνδυασμό με την ορμονοθεραπεία επιτυγχάνεται η επιμήκυνση της επιβίωσης, ο έλεγχος της νόσου καθώς και μια αρκετά καλή ποιότητα ζωής. Οι στοχευμένες θεραπείες βασίζονται στην υποκείμενη βιολογία του καρκίνου και παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια.⁴⁴ Για τον HER2 (+) καρκίνο του μαστού, το μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, αποτελούν τη θεραπεία πρώτης γραμμής.⁴⁵ Το Lapatanib, είναι ένας αναστολέας της HER2 πρωτεΐνης που χορηγείται από το στόμα και όταν χορηγείται σε συνδυασμό με Capecitabine ή από του στόματος 5-FU βελτιώνει το διάστημα χωρίς επιδείνωση της νόσου κατά 4 μήνες σε γυναίκες που λάμβαναν ήδη το trastuzumab. Το Bevacizumab, ένα αντίσωμα έναντι του VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), αναστέλλει την αγγειογένεση και όταν συνδυάζεται με πλατίνα παρατείνει το χρόνο εξέλιξης της νόσου κατά 6 μήνες στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Η κατανόηση των μοριακών μεταβολών που συμβαίνουν κατά την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού θα οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών σχημάτων, επιφέροντας ακόμα μεγαλύτερη επιβίωση και καλύτερη ποιότητα ζωής για τους ασθενείς.⁴⁶

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

1. ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η καρκινογένεση χαρακτηρίζεται από πολλές δυναμικές μεταβολές στο γονιδίωμα. Πληθώρα μεταλλάξεων οδηγεί στην ενεργοποίηση ογκογονιδίων με αυξημένη λειτουργικότητα και την προοδευτική απώλεια της λειτουργικότητας ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τις τελευταίες δεκαετίες η έρευνα έχει αναδείξει ορισμένες μοριακές, βιοχημικές και κυτταρικές επίκτητες αλλαγές που είναι κοινές για τους περισσότερους τύπους του καρκίνου. Αυτό ίσως οφείλεται στην ύπαρξη παρομοίων μηχανισμών σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και το θάνατό τους.

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών στη βιβλιογραφία υποστηρίζει πως το γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων είναι αλλαγμένο σε πολλαπλές θέσεις, με βλάβες όπως οι στοιχειακές μεταλλάξεις ή οι χρωμοσωμιακές μεταβολές έχοντας ως αποτέλεσμα μεταβολές σε ρυθμιστικά συστήματα που διέπουν τον πολλαπλασιασμό και την ομοιόσταση των φυσιολογικών κυττάρων. Φαίνεται λοιπόν πως μία αλληλουχία γενετικών μεταβολών οδηγεί σε μία προοδευτική εξαλλαγή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα. Όπως προκύπτει από κυτταρικές καλλιέργειες η εξαλλαγή είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων. Τα κύτταρα των περισσότερων

πειραματικών μοντέλων χρειάζονται τουλάχιστον 2 γενετικές μεταβολές πριν να αποκτήσουν ογκογενετική ικανότητα, ενώ τα αντίστοιχα κύτταρα του ανθρώπου περισσότερες.

Η εξέλιξη του καρκίνου φαίνεται πως είναι λοιπόν μία διαδικασία πολλών σταδίων κάθε ένα εκ των οποίων αντανακλά συγκεκριμένες γενετικές μεταβολές που οδηγούν στη μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα και στη μετάσταση τους. Η φυσική εξέλιξη των περισσότερων κακοηθών νεοπλασμάτων μπορεί να διακριθεί σε τέσσερα στάδια: τη διαφοροποίηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την τοπική διήθηση και τις απομακρυσμένες μεταστάσεις.⁴⁷

A. Διαφοροποίηση

Με τον όρο διαφοροποίηση, αναφερόμαστε στο βαθμό κατά τον οποίο τα νεοπλασματικά κύτταρα μοιάζουν με τα φυσιολογικά, σε μορφολογικό και λειτουργικό επίπεδο. Οι καλοήθεις όγκοι είναι υψηλής διαφοροποίησης. Αντιθέτως, τα κακοήθη νεοπλάσματα ποικίλλουν σε διαφοροποίηση, από υψηλής διαφοροποίησης έως και πλήρως αδιαφοροποίητα, που καλούνται αναπλαστικά. Ο όρος *δυσπλασία* αναφέρεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα και χαρακτηρίζεται από ένα σύνολο αλλαγών που περιλαμβάνουν την απώλεια της ομοιομορφίας μεμονωμένων κυττάρων και την απώλεια του αρχιτεκτονικού τους προσανατολισμού. Όταν οι δυσπλαστικές αλλαγές είναι εξεσημασμένες και αφορούν σε όλο το πάχος του επιθηλίου, η βλάβη όμως παραμένει περιορισμένη στο φυσιολογικό ιστό, τότε θεωρείται προδιηθητικό νεόπλασμα και ονομάζεται *in situ* καρκίνωμα. Όταν τα καρκινικά κύτταρα ξεφεύγουν από τα όρια του φυσιολογικού ιστού, ο όγκος

θεωρείται διηθητικός. Εντούτοις, ήπιες έως μέτριες μεταβολές που δεν αφορούν σε όλο το πάχος του επιθηλίου μπορεί να είναι αναστρέψιμες και με απομάκρυνση των γενεσιουργών παραγόντων, το επιθήλιο μπορεί να επιστρέψει στην πρότερη φυσιολογική του κατάσταση.

Είναι αυτονόητο πως όσο υψηλότερη είναι η διαφοροποίηση των εξαλλαγμένων κυττάρων, τόσο περισσότερες από τις φυσιολογικές λειτουργικές ικανότητες αυτά διατηρούν. Οι μορφολογικές αλλαγές που χαρακτηρίζουν την έλλειψη διαφοροποίησης, που αποτελεί και τη βάση της κακοήθους εξαλλαγής, είναι ο πλειομορφισμός, η ύπαρξη ανώμαλων κυτταρικών πυρήνων, η αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα, η απώλεια προσανατολισμού και η ισχαιμική νέκρωση. Με βάση μόνο τη μορφολογία τους, οι κακοήθεις όγκοι καλής διαφοροποίησης μπορεί να είναι δύσκολο να διαφοροδιαγνωστούν από τους καλοήθεις όγκους.⁴⁸

B. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Ο ρυθμός αύξησης ενός όγκου καθορίζεται από τρεις παράγοντες: το χρόνο διπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, το κλάσμα των κυττάρων του όγκου που βρίσκονται σε φάση αντιγραφής (κλάσμα αύξησης) και τη συχνότητα με την οποία τα κύτταρα πεθαίνουν μέσα στον νεόπλασμα. Πολλές πειραματικές μελέτες δείχνουν πως στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του όγκου, τα περισσότερα κύτταρα βρίσκονται σε φάση αντιγραφής και πολλαπλασιασμού. Καθώς ο όγκος μεγαλώνει, τα κύτταρα βγαίνουν από την αντιγραφική φάση εξαιτίας της έλλειψης θρεπτικών συστατικών, της απόπτωσης ή της διαφοροποίησης.

Η λανθάνουσα περίοδος πριν την κλινική διαπίστωση της ύπαρξης όγκου δεν μπορεί να προβλεφθεί, τυπικά όμως αφορά σε χρονικό διάστημα από 90 ημέρες έως και πολλά χρόνια για τους περισσότερους συμπαγείς όγκους. Επιπρόσθετα, σε γενικές γραμμές, ο ρυθμός αύξησης των όγκων σχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησής τους. Έτσι, οι περισσότεροι κακοήθεις όγκοι αυξάνονται με ταχύτερους ρυθμούς από τους καλοήθεις. Όταν πλέον ο όγκος είναι κλινικά ανιχνεύσιμος, τα περισσότερα κύτταρα δεν βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού. Ακόμα και σε όγκους ταχείας ανάπτυξης, το κλάσμα αύξησης είναι μόλις 20% ή και λιγότερο. Στον καρκίνο του μαστού, όπως και στην οξεία μυελοειδή λευχαιμία, τα καρκινικά κύτταρα προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό ενός αρχέγονου κυττάρου, του κυττάρου έναρξης όγκου (tumorigenic cells, T-IC). Τα κύτταρα έναρξης όγκου αποτελούν συνήθως λιγότερο από το 2% του συνολικού αριθμού των κυττάρων του.⁴⁷

Γ. Τοπική διήθηση

Οι όγκοι αποτελούνται από δύο βασικά χαρακτηριστικά: το παρέγχυμα, που αποτελείται από νεοπλασματικά κύτταρα και το στρώμα, που αποτελείται από συνδετικό ιστό και αγγεία. Η ανάπτυξη των όγκων συνοδεύεται από προοδευτική διήθηση και καταστροφή των γύρω ιστών. Μετά την ανάπτυξη μεταστάσεων, η ικανότητα διήθησης είναι το πιο αξιόπιστο χαρακτηριστικό που διακρίνει τους κακοήθεις από τους καλοήθεις όγκους. Οι περισσότεροι κακοήθεις όγκοι είναι διεισδυτικοί και παραβιάζουν φυσικά ανατομικά όρια.⁴⁹

Δ. Μετάσταση

Η μετάσταση, χωρίς καμία αμφιβολία, είναι το βασικό χαρακτηριστικό των κακοηθών όγκων, καθώς οι καλοήθειες δε μεθίστανται. Με εξαίρεση τα γλοιώματα και το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος, όλοι οι καρκίνοι μπορούν να μεθίστανται. Η διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων επιτρέπει την είσοδό τους στα αιμοφόρα αγγεία, τα λεμφαγγεία και τις κοιλότητες του σώματος, οδηγώντας έτσι σε διασπορά της νόσου μέσω τριών οδών: μέσω του άμεσου ενοφθαλμισμού των κοιλοτήτων ή των επιφανειών του σώματος, διαμέσου της λεμφικής οδού και αιματογενώς.

Διασπορά σε κοιλότητες και επιφάνειες του σώματος συμβαίνει συνήθως στην περιτοναϊκή κοιλότητα, αλλά μπορεί να συμβεί και σε οποιαδήποτε άλλη κοιλότητα. Τα καρκινώματα, όπως και τα σαρκώματα χρησιμοποιούν συχνότερα την λεμφική διασπορά, μέσω της φυσιολογικής οδού της λεμφικής αποχέτευσης. Έτσι, τα καρκινώματα του άνω έξω τεταρτημορίου του μαστού συνήθως πρώτα μεθίστανται στους μασχالياίους λεμφαδένες, ενώ η λεμφική απορροή των καρκινωμάτων των έσω τεταρτημορίων αφορά συνήθως τους λεμφαδένες του θώρακα κατά μήκος των έσω μαστικών αρτηριών, εμπλέκοντας τους υποκλείδιους και υπερκλείδιους λεμφαδένες. Σήμερα ο καρκίνος του μαστού θεωρείται συστηματική νόσος, ακόμα και κατά τη στιγμή της διάγνωσης, οπότε η θεραπεία αφορά τόσο στον τοπικό έλεγχο της νόσου, όσο και στην εξάλειψη συστηματικών μικρομεταστάσεων. Η αιματογενής διασπορά χαρακτηρίζει συνήθως τα σαρκώματα, αλλά μπορεί να παρατηρηθεί και σε οποιοδήποτε καρκίνο. Η διασπορά επιτυγχάνεται συνήθως μέσω του φλεβικού δικτύου, διότι το αρτηριακό τοίχωμα διηθείται δυσκολότερα και τα όργανα που

προσβάλλονται συχνότερα από δευτεροπαθείς εντοπίσεις είναι το ήπαρ και οι πνεύμονες.⁵⁰

2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ

Έχουν περιγραφεί οι εξής 6 μηχανισμοί στην κυτταρική φυσιολογία που οδηγούν στην ανάπτυξη κακοήθειας, οι οποίοι είναι κοινοί για όλους τους τύπους καρκίνου:

A. Αυτονομία απέναντι στα αυξητικά ερεθίσματα

Τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται ότι πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από εξωγενείς αυξητικούς παράγοντες, καθώς μειώνουν την εξάρτησή τους από το μικροπεριβάλλον τους παράγοντας δικούς τους αυξητικούς παράγοντες. Έτσι, συμπεριφέρονται ανεξάρτητα από ομοιοστατικούς μηχανισμούς που υπό φυσιολογικές συνθήκες διατηρούν το κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε φυσιολογικά επίπεδα. Αντίθετα, τα φυσιολογικά κύτταρα απαιτούν μιτογόνα αυξητικά ερεθίσματα, πριν περάσουν σε φάση πολλαπλασιασμού, τα οποία μεταδίδονται μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων, όπου συνδέονται παράγοντες και εξωκυττάρια συστατικά που λειτουργούν σαν σηματοδότες. Οι μιτογόνοι παράγοντες παράγονται συνήθως από μία κατηγορία κυττάρων και δρουν σε μία άλλη. Επομένως, η παραγωγή αυξητικών παραγόντων από καρκινικά κύτταρα που δρουν πάνω στα ίδια, προάγοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό τους και προκαλώντας μια θετική ρύθμιση που καλείται αυτοκρινής διέγερση, τα καθιστά ανεξάρτητα από τα υπόλοιπα κύτταρα των ιστών.

Μεταβολή παρατηρείται επίσης στους υποδοχείς στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων που επάγουν τους αυξητικούς παράγοντες, καθιστώντας τα καρκινικά κύτταρα υπερευαίσθητα ακόμα και σε φυσιολογικά επίπεδα αυξητικών παραγόντων που δεν προκαλούν υπό κανονικές συνθήκες κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Για παράδειγμα, ο υποδοχέας HER2/neu υπερεκφράζεται σε καρκίνο του στομάχου και μαστού και ο επιφανειακός αυξητικός παράγοντας EGF-R/erbB είναι αυξημένος στον καρκίνο του στομάχου, του εγκεφάλου και του μαστού. Επιπλέον, μπορεί επίσης να παρατηρηθεί μεταβολή των εξωκυττάρων υποδοχέων του στρώματος που εκφράζουν τα καρκινικά κύτταρα, υπέρ εκείνων που προάγουν την αύξηση. Νέα δεδομένα υποδεικνύουν ότι πολλά από τα σήματα που ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων προέρχονται από τα στρωματικά κύτταρα του όγκου, γεγονός που δεν έχει ακόμα αποδειχθεί στην πράξη. Η θεωρία αυτή τροποποιεί κατά ένα βαθμό τη θεώρηση της αυτονομίας των καρκινικών κυττάρων: πιο επιθετικά είναι τα καρκινικά κύτταρα που έχουν αποκτήσει την ικανότητα να επάγουν την παραγωγή αυξητικών παραγόντων από τα φυσιολογικά κύτταρα που γειτνιάζουν. Επιπλέον, τα φλεγμονώδη κύτταρα που προσελκύονται στην περιοχή του όγκου μπορεί αντί να καταστείλουν να προάγουν την αύξηση των καρκινικών κυττάρων.^{51,52}

Β.Απευαισθητοποίηση απέναντι στα ερεθίσματα καταστολής του πολλαπλασιασμού

Στους φυσιολογικούς ιστούς η ομοιόσταση και η αναστολή του υπέρμετρου κυτταρικού πολλαπλασιασμού επιτυγχάνονται μέσω πολλών ερεθισμάτων που επάγονται από κυκλοφορούντες παράγοντες αναστολής της αύξησης και από καθηλωμένους παράγοντες στο εξωκυττάριο στρώμα, που δρουν μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων της επιφάνειας των κυττάρων. Φυσιολογικά, τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου λαμβάνουν ερεθίσματα από το εξωτερικό περιβάλλον προκειμένου να παραμείνουν στη φάση αυτή ή να εισέλθουν σε μία μετά-μιτωτική φάση διαφοροποίησης. Επιπρόσθετα, τα φυσιολογικά κύτταρα περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό με την ανεπιστρεπτή είσοδό τους σε φάση πλήρους διαφοροποίησης. Τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να παρακάμψουν τα παραπάνω ερεθίσματα καταστολής της αύξησης και είσοδό τους σε φάση πλήρους διαφοροποίησης και να αναπτυχθούν.

Ο TGF- β αποτελεί τον καλύτερα μελετημένο παράγοντα σε αυτήν την κατηγορία. Εμποδίζει τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της pRb, εμποδίζοντας έτσι τη μετάβαση στη φάση G1 και επιπλέον εμποδίζει την έκφραση του γονιδίου c-myc, που εκφράζεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, αμέσως μόλις λάβουν ερέθισμα προς πολλαπλασιασμό. Η πρωτεΐνη myc σχηματίζει διμερή τα οποία συνδέονται στα γονίδια-στόχο του DNA κάποια εκ των οποίων σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αποτελούν ένα ισχυρό ενεργοποιητή μεταγραφής. Επίσης τα γονίδια myc συνδέονται με ακετυλίωση ιστονών, ελαττωμένη προσκόλληση

κυττάρων και αυξημένη κινητικότητα κυττάρων, αυξημένη σύνθεση πρωτεϊνών και ελαττωμένη δράση πρωτεασών.⁵³

Επιπλέον, σε μοριακό επίπεδο, πολλά από τα σήματα που αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μεταφέρονται μέσω της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) και δύο ομολόγων της p107 και p130. Όταν είναι υποφωσφορυλιωμένη, η pRb αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με τη μεταβολή της λειτουργίας των μεταγραφικών παραγόντων E2F που ελέγχουν την έκφραση γονιδίων απαραίτητων για την μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η διακοπή της οδού της pRb επάγει την απελευθέρωση παραγόντων E2F οπότε τα κύτταρα δεν είναι πλέον ευαίσθητα σε παράγοντες καταστολής του πολλαπλασιασμού και επιτρέπεται ο πολλαπλασιασμός.

Τόσο το κύκλωμα της pRb, όσο και ο κυτταρικός κύκλος πολλαπλασιασμού διακόπτονται με τον ένα τρόπο ή τον άλλο στους διάφορους τύπους του καρκίνου, με αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητας καταστολής του όγκου. Σε κάθε τύπο καρκίνου διαφορετικοί παράγοντες μπορεί να παρέμβουν στο σύστημα pRb. Σε μερικούς μειώνονται οι υποδοχείς TGF- β ενώ σε άλλους οι υποδοχείς μεταβάλλονται μοριακά και παραβλάπεται η συγγενειά τους με τον TGF- β . Μπορεί επίσης να μεταλλαχθούν γονίδια υπεύθυνα για τις ενδιάμεσες πρωτεΐνες-μεταφορείς ερεθισμάτων από τον υποδοχέα του TGF- β όπως η πρωτεΐνη Smad 4, γονίδια υπεύθυνα για το p15 που μεταβιβάζει ερεθίσματα κατασταλτικά του πολλαπλασιασμού, γονίδια υπεύθυνα για το CDK4 που αποτελεί στόχο του p15 καθώς επίσης και το ίδιο το γονίδιο της pRb. Επιπρόσθετα, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να παρεμποδίσουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης και ιντεγκρινών που μεταφέρουν ερεθίσματα κατασταλτικά του πολλαπλασιασμού, ευνοώντας αυξητικά

ερεθίσματα. Τα συγκεκριμένα ερεθίσματα φαίνεται να παρεμβαίνουν και πάλι στο σύστημα pRb.⁵⁴

Γ. Παράκαμψη της απόπτωσης

Ως απόπτωση χαρακτηρίζεται μία σειρά γεγονότων που έχει ως τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο μέσω της ενεργοποίησης πρωτεολυτικών ενζύμων. Η απόπτωση βρίσκεται σε λανθάνουσα προγραμματισμένη μορφή σχεδόν σε όλους τους τύπους των κυττάρων. Κατά την διάρκεια και σε χρονικό διάστημα 30-120 λεπτών της καταστρέφονται κυτταρικές μεμβράνες, κατακερματίζονται οι σκελετοί του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα, εξωκυτταρώνεται το κυτταρόπλασμα, αποδομούνται τα χρωμοσώματα και διαλύεται ο πυρήνας. Το κατακερματισμένο κύτταρο συνήθως φαγοκυτταρώνεται από περιβάλλοντα κύτταρα εντός 24 ωρών. Στο μηχανισμό συμμετέχουν δύο κατηγορίες μορίων: οι δέκτες, που καθορίζουν με βάση τις έξωκυττάρια και ενδοκυττάρια συνθήκες ποια κύτταρα θα ζήσουν ή θα νεκρωθούν και οι τελεστές, που εκτελούν την κυτταρική καταστροφή.

Τα ερεθίσματα της απόπτωσης δρουν κυρίως στα μιτοχόνδρια, μέσω υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης που είναι ειδικοί για την απόπτωση ή την κυτταρική επιβίωση. Τα σύμπλοκα μόρια IGF-1/IGF-2, ο υποδοχέας IGF-1R, το IL-3 και ο υποδοχέας του σχετίζονται με την επιβίωση. Για τον κυτταρικό θάνατο αντίστοιχα υπεύθυνα είναι το μόριο σύνδεσης FAS και το TNF (Tumor Necrosis Factor) με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους.

Στα μιτοχόνδρια ενεργοποιείται το κυτόχρωμα C που αποτελεί ισχυρό καταλύτη της απόπτωσης. Η ρύθμιση της εξόδου του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα ρυθμίζεται από μία μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών του bcl-2. Από τις πρωτεΐνες της

ομάδας, άλλες έχουν σαν αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης όπως η bcl-2 και η bcl-xL και άλλες την ευόδωση της, όπως οι πρωτεΐνες bax, bad και bcl-Xs. Η αναλογία αγωνιστών και ανταγωνιστών της απόπτωσης θα καθορίσει και την έναρξη ή την αναστολή της. Οι κασπάσες είναι μία ομάδα ενδοκυττάρων πρωτεασών που λειτουργούν ως τελεστές της απόπτωσης και ενεργοποιούνται από υποδοχείς όπως το FAS και το κυτόχρωμα C. Η ενεργοποίησή τους έχει ως αποτέλεσμα και την επιλεκτική καταστροφή των κυτταρικών συστατικών.

Όσο σημαντικός είναι ο υπέρμετρος πολλαπλασιασμός για την ανάπτυξη του όγκου, άλλο τόσο σημαντική είναι η αποφυγή της φθοράς τους. Ο μηχανισμός της απόπτωσης επομένως αποτελεί φραγμό στην ανάπτυξη του καρκίνου. Το πρωτογονίδιο c-myc και το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 σχετίζονται με την ρύθμιση της απόπτωσης. Η πιο συχνή απώλεια της ρύθμισης της απόπτωσης αφορά στο γονίδιο p53, που ανευρίσκεται σε πάνω από το 50% των καρκίνων του ανθρώπου και οδηγεί στην απομάκρυνση του «συναγερμού» των βλαβών του DNA, γεγονός που επάγει την έναρξη της απόπτωσης. Η υποξία και η υπερέκφραση ογκογονιδίων δρουν επίσης μέσω του p53.^{55,56}

Δ. Απεριόριστη δυνατότητα πολλαπλασιασμού

Τα φυσιολογικά κύτταρα φαίνεται μετά από συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων να χάνουν πλέον την ικανότητα του πολλαπλασιασμού και να εισέρχονται σε φάση γήρανσης. Η φάση της γήρανσης μπορεί να παρακαμφθεί με την απενεργοποίηση των pRb και p53 ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, καθιστώντας τα κύτταρα αυτά ικανά για περαιτέρω πολλαπλασιασμό, ώσπου να εισέλθουν εκ νέου σε τελική φάση γήρανσης. Αυτή η τελική φάση χαρακτηρίζεται καρυοτυπική αποδιοργάνωση και από μαζικό

θάνατο κυττάρων, ενώ μερικές φορές έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός κυττάρου που καθίσταται αθάνατο, έχει δηλαδή την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται χωρίς περιορισμό. Αυτή η ικανότητα προς απεριόριστο πολλαπλασιασμό είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη κακοήθειας και την εξέλιξη του όγκου.

Μετά από κάθε διαίρεση, τα τελικά τμήματα των χρωμοσωμάτων, που καλούνται τελομερή, υφίστανται βράχυνση. Μετά από διαδοχικές βραχύνσεις και πέρα από κάποιο όριο, χάνεται η ικανότητα των τελομερών να προστατεύουν το τελικό άκρο του DNA, με αποτέλεσμα την σύντηξη των χρωμοσωμάτων και τον κυτταρικό θάνατο. Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση των τελομερών περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του ALT μηχανισμού που διατηρεί τα τελομερή με ανασυνδυασμούς του DNA και την ενεργοποίηση της τελομεράσης, ενζύμου που προσθέτει εξωνουκλεοτιδικές αλληλουχίες στα άκρα του DNA. Σχεδόν όλα τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα της διατήρησης των τελομερών των χρωμοσωμάτων, γεγονός που συνεπάγεται πολλαπλασιασμό χωρίς όριο στον αριθμό των διαιρέσεων και μεγαλύτερη επιβίωση.⁵²

E. Νεοαγγειογένεση

Η αγγείωση εξασφαλίζει στους ιστούς και στα κύτταρα τους οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την λειτουργία και την επιβίωσή τους. Κατά την οργανογένεση, αγγεία και παρέγχυμα αναπτύσσονται συγχρόνως και φαίνεται μάλιστα ότι τα κύτταρα μέσα από μοριακούς μηχανισμούς προκαλούν την ανάπτυξη της αγγείωσης που θα τα υποστηρίξει. Τα καρκινικά κύτταρα στα αρχικά στάδια έχουν απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού αλλά όχι και την ικανότητα

αγγειογένεσης με αποτέλεσμα τη διατήρηση του νεοπλασματικού όγκου σε μικρό μέγεθος. Η νεοαγγειογένεση είναι απαραίτητη προκειμένου να αναπτυχθεί ο όγκος και να δώσει μετάσταση.

Οι αγγειογενετικοί παράγοντες των όγκων παράγονται είτε από τα ίδια τα κύτταρα του όγκου είτε από φλεγμονώδη κύτταρα που τον διηθούν και συνδέονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω υποδοχέων, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό τους. Οι σημαντικότεροι εξ αυτών είναι ο VEGF (αγγειακός παράγοντας αύξησης του ενδοθηλίου, vascular endothelial growth factor) και ο aFGF/bFGF (όξινο και βασικός παράγοντας αύξησης των ινοβλαστών, acidic/basic fibroblast growth factor). Τα κύτταρα παράγουν επίσης και αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως η θρομβοσπονδίνη 1, η αγγειοστατίνη (παράγωγο της πρωτεόλυσης του πλασμινογόνου) και η ενδοστατίνη (παράγωγο της πρωτεόλυσης του κολλαγόνου). Η ισορροπία ανάμεσα στους αγγειογενετικούς και αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες διατηρείται στους φυσιολογικούς ιστούς, αλλά στους καρκινικούς εκτρέπεται υπέρ των αγγειογενετικών παραγόντων. Σε ορισμένους όγκους μάλιστα οι αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες καταστέλλονται πλήρως.

ΣΤ. Ιστική διήθηση και μετάσταση

Η μετάσταση ευθύνεται για το 90% των θανάτων από καρκίνο. Κατά την εξέλιξη του καρκίνου ορισμένα κύτταρα ξεκινούν από την πρωτοπαθή μάζα και διηθούν αρχικά τους γύρω ιστούς και στη συνέχεια ταξιδεύουν σε απομακρυσμένα σημεία, όπου συχνά επιτυγχάνουν τη δημιουργία νέων αποικιών. Η διήθηση και η μετάσταση είναι πολύπλοκες διαδικασίες, σε άμεση σχέση μεταξύ τους, και το γενετικό και βιοχημικό

τους υπόστρωμα δεν είναι ακόμα καλά πλήρως κατανοητό. Σε μοριακό επίπεδο οι μηχανισμοί τους περιλαμβάνουν μεταβολές της συνάφειας των κυττάρων μεταξύ τους και με το μικροπεριβάλλον τους και την ενεργοποίηση εξωκυττάρων πρωτεασών.

Αρκετές κατηγορίες πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διατήρηση της συνοχής των κυττάρων μεταξύ τους και με το περιβάλλον τους υφίστανται μεταβολές, με αποτέλεσμα την απόκτηση ικανότητας διήθησης και μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Τέτοιες είναι οι ιντεγκρίνες που συνδέουν τα κύτταρα με τα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και τα μόρια προσκόλλησης που σχετίζονται με τη σύνδεση μεταξύ κυττάρων (cell-cell adhesion molecules, CAMs), με κύριο εκπρόσωπο την καδερίνη E, κατασταλτικό παράγοντα της διήθησης και της μετάστασης. Όσον αφορά τις ιντεγκρίνες, φαίνεται πως τα μεθιστάμενα καρκινικά κύτταρα για να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον μεταβάλλουν το φάσμα των ιντεγκρινών που εκφράζουν.

Στη διήθηση και μετάσταση των ιστών σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι εξωκυττάριας πρωτεάσες. Κύτταρα που διαθέτουν πρωτεολυτικά ένζυμα στην επιφάνειά τους εύκολα διηθούν το στρώμα, τα γειτονικά αγγεία και τα στρώματα του φυσιολογικού γεινιαζοντος επιθηλίου. Επιλέον, οι πρωτεάσες συμβάλλουν στην αγγειογένεση και τον πολλαπλασιασμό, στη διήθηση και τη μετάσταση.⁵³

Τα καρκινικά κύτταρα μετακινούνται δια μέσου των πρωτεολυμένων στοιχείων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας τόσο με τη βοήθεια αυτοκρινών παραγόντων κινητικότητας που παράγουν όσο και προϊόντων αποδόμησης του εξωκυττάρου χώρου. Τα τελευταία προέρχονται από τις πρωτεογλυκάνες και το κολλαγόνο, έχουν αγγειοκινητικές και χημειοτακτικές ιδιότητες και προωθούν τη μετακίνηση των

κυττάρων. Όταν τα καρκινικά κύτταρα περάσουν στην κυκλοφορία, αθροίζονται σε ομάδες μέσω ομοτυπικών συνδέσεων μεταξύ τους και ετεροτυπικών συνδέσεων με τα κύτταρα του αίματος, κυρίως των αιμοπεταλίων. Στη συνέχεια, προσκολλώνται στο ενδοθήλιο των αγγείων με τη βοήθεια του μορίου CD44 που διευκολύνει την αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με το ενδοθήλιο. Στη συνέχεια, με τη συμμετοχή πρωτεασών και ιντεγκρινών, τα κύτταρα αλληλεπιδρούν με τους ιστούς υποδοχής, με τελικό αποτέλεσμα την εισβολή σε αυτούς.

3. ΘΕΜΕΛΙΩΔΕΙΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η καρκινογένεση είναι μια σύνθετη διαδικασία που παρά τη μεγάλη ποικιλία των ιστολογικών μορφών του καρκίνου χαρακτηρίζεται από ορισμένες θεμελιώδεις κοινές αρχές:

A. Γενετικές αλλοιώσεις

Η γενετική υπόθεση του καρκίνου στηρίζεται στο γεγονός ότι το σύνολο των καρκινικών κυττάρων αποτελούν τον κλώνο ενός πρόδρομου κυττάρου που έχει υποστεί γενετική εξαλλαγή, με επακόλουθο τη μεταβίβαση των μεταλλάξεων αυτών στα κύτταρα απογόνους του κυττάρου αυτού. Η δημιουργία και ο σχηματισμός ενός όγκου προκαλείται επομένως από την κλωνική επέκταση ενός μοναδικού πρόδρομου κυττάρου, το οποίο έχει υποστεί γενετική μετάλλαξη. Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι

κληρονομικές ή επίκτητες. Οι επίκτητες γενετικές βλάβες είναι συνήθως αποτέλεσμα δράσης περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως είναι η ακτινοβολία, οι χημικές ουσίες και διάφοροι ιοί

Οι βασικές κατηγορίες γονιδίων που ενέχονται στη διαδικασία της καρκινογένεσης είναι τρεις:

α) *τα πρωτοογκογονίδια*, που ευνοούν την καρκινογένεση και την ανάπτυξη του όγκου. Οι μεταλλάξεις τους συμπεριφέρονται με τον επικρατούντα χαρακτήρα, καθώς αλλοίωση σε ένα μόνο αλληλίο αρκεί για να μετασχηματίσει τα κύτταρα παρά την παρουσία των φυσιολογικών αντιγράφων. Υπάρχουν όμως ορισμένες εξαιρέσεις και κάποια ογκοκατασταλτικά γονίδια χάνουν την ιδιότητά τους όταν ένα και μόνο αλληλίο απολεσθεί ή δεν ενεργοποιηθεί

β) *τα ογκοκατασταλτικά γονίδια*, που αναστέλλουν την ανάπτυξη του όγκου. Για την έκφραση των μεταλλάξεών τους, πρέπει να υποστούν βλάβη και τα δύο αλληλία, και η κατηγορία αυτή των γονιδίων χαρακτηρίζεται σαν υπολειπόμενα γονίδια.

γ) *γονίδια σχετιζόμενα με τις επιδιορθώσεις του γενετικού υλικού*. Τα γονίδια αυτά καθορίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή την επιβίωση έμμεσα, επηρεάζοντας την ικανότητα του οργανισμού να επιδιορθώνει μη θανατηφόρες βλάβες σε άλλα γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, των πρωτοογκογονιδίων και των γονιδίων που ρυθμίζουν την απόπτωση. Η ανεπάρκεια στην επιδιόρθωση του DNA προδιαθέτει σε μεταλλάξεις του γονιδιώματος και νεοπλασματικό μετασχηματισμό. Εκτός από μερικές εξαιρέσεις, θα πρέπει και τα δύο αλληλία των γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA να απενεργοποιηθούν για την επαγωγή μίας γονιδιακής αστάθειας. Μεταλλάξεις σε τέτοια γονίδια παρατηρούνται σε

καταστάσεις που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη καρκίνου, όπως η αταξία-τηλεαγγειεκτασία, η μελαγχρωστική ξηροδερμία και η αναιμία Fanconi.⁵⁸

B. Διαδικασία πολλών σταδίων

Η καρκινογένεση είναι μια πολυβαθμιδωτή διαδικασία, τόσο σε επίπεδο γενετικό όσο και σε επίπεδο φαινοτυπικό. Σε μοριακό επίπεδο, επιτυγχάνεται μέσω της συνάθροισης γενετικών βλαβών, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ογκογονιδίων, απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή απώλεια της δράσης διορθωτικών γονιδίων. Ο κανόνας είναι ότι μία μονάχα γενετική βλάβη δεν είναι αρκετή για τη δημιουργία κακοήθους νεοπλασματος. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, ο καρκίνος έχει ίδια, επίκτητα χαρακτηριστικά, όπως υπέρμετρη αύξηση, αποφυγή της απόπτωσης, διήθηση των ιστών και μετάσταση. Οι ιδιότητες αυτές αποκτώνται σταδιακά και το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εξέλιξη του όγκου.⁵⁹

Γ. Γενετική αστάθεια

Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από γενετική αστάθεια, τόσο σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, όσο και σε χρωμοσωμικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, στους διάφορους τύπους καρκίνου παρατηρούνται μεταλλάξεις που αφορούν σε αντικαταστάσεις βάσεων, ελλείψεις ή προσθήκες ενός ή λίγων νουκλεοτιδίων και αλλαγές στην αλληλουχία ορισμένων γονιδίων στόχων. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις μπορεί να αφορούν στον αριθμό των χρωμοσωμάτων (ανευπλοειδία), σε μεταθέσεις χρωμοσωμάτων (σύντηξη, ένωση και μετατόπιση τμημάτων διαφορετικών, συνήθως, χρωμοσωμάτων) και στη γονιδιακή ενίσχυση (αντιγραφή της ίδιας αλληλουχίας). Ενώ αυτές οι μεταβολές δεν

ανιχνεύονται με κυτταρογενετικές μεθόδους, με μοριακές τεχνικές είναι ορατές στο πλέον του 80% των καρκίνων.

Η συχνότητα μεταλλάξεων έχει την ίδια πιθανότητα να συμβεί τόσο στα καρκινικά όσο και στα φυσιολογικά κύτταρα. Οι μεταλλάξεις όμως των φυσιολογικών κυττάρων εξαλείφονται μέσω της απόπτωσης, που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, προστατεύοντας από ανεπανόρθωτες γενετικές βλάβες. Γενετικά ασταθή θεωρούνται κύτταρα στα οποία το γενετικό υλικό αλλάζει συνεχώς. Σε επίπεδο χρωμοσωμάτων, η γενετική αστάθεια καλείται χρωμοσωμιακή αστάθεια και περιλαμβάνει τις μεταλλάξεις του αριθμού των χρωμοσωμάτων, τις μεταθέσεις και τη γονιδιακή ενίσχυση. Σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, η αστάθεια διακρίνεται στη νουκλεοτιδική αστάθεια που αφορά σε μεταλλάξεις νουκλεοτιδίων και στη μικροδορυφορική αστάθεια που αφορά σε προσθήκες ή επαναλήψεις ακολουθιών νουκλεοτιδίων. Η γενετική αστάθεια των όγκων υποδηλώνει μία κατάσταση ρευστότητας και αντικατοπτρίζει, εκτός από την ύπαρξη μεταλλάξεων, το ρυθμό με τον οποίο αυτές συμβαίνουν.⁶⁰

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

1. ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού συνιστά μια πολύπλοκη διαδικασία που χαρακτηρίζεται από τη μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά μέσω των σταδίων της υπερπλασίας, της προκαρκινωματώδους εξαλλαγής και του *in situ* καρκινώματος. Η γενετική προδιάθεση σε συνδυασμό με την επίδραση μεταβολικών και περιβαλλοντικών παραγόντων όπως και στις άλλες μορφές καρκίνου, έτσι και στον καρκίνο του μαστού συμβάλλουν συνεργικά στην εμφάνιση του.

Ο καρκίνος του μαστού διακρίνεται σε σποραδικό, οικογενή και κληρονομικό (διαχωρισμός κατά Lynch). Ο σποραδικός καρκίνος του μαστού αποτελεί το 68% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού και χαρακτηρίζεται από απουσία ιστορικού στην οικογένεια. Ο οικογενής καρκίνος του μαστού είναι πιθανόν αποτέλεσμα μεταβολών σε γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας σε συνδυασμό με περιβαλλοντικές επιδράσεις. Περιλαμβάνει το 23% των περιπτώσεων και υπάρχει ιστορικό καρκίνου του μαστού σε έναν ή περισσότερους πρώτου ή δευτέρου βαθμού συγγενείς. Ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού είναι λιγότερο συχνός. Η νόσος παρουσιάζει στην οικογένεια του ασθενούς υψηλή συχνότητα εμφάνισης και είναι αποτέλεσμα της κληρονομικότητας μίας υψηλής διεισδυτικότητας μετάλλαξης σε ένα μόνο γονίδιο που ευθύνεται για το 10% των περιπτώσεων εμφάνισης καρκίνου του μαστού.⁶¹

Σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του κληρονομικού καρκίνου του μαστού διαδραματίζουν οι μεταλλάξεις στα γονίδια **BRCA1** και **BRCA2**. Τα γονίδια αυτά έχουν ογκοκατασταλτική δράση και οι μεταλλάξεις κληρονομούνται κατά τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα. Το γονίδιο BRCA1 ανακαλύφθηκε το 1990 και χαρτογραφήθηκε το 1994, έχει 22 εξόνια, αποτελείται από 5592 νουκλεοτίδια και βρίσκεται στη θέση q12-q21 του χρωμοσώματος 17. Το γονίδιο αυτό επάγει τη σύνθεση μιας μεγάλης πυρηνικής φωσφοπρωτεΐνης, που αποτελείται από 1863 αμινοξέα και φωσφορυλιώνεται με τρόπο κυκλινοεξαρτώμενο. Δύο περιοχές του γονιδίου παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η πρώτη εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο και κωδικοποιεί ένα τμήμα της πρωτεΐνης με δακτυλιοειδή διαμόρφωση, που παρατηρείται συχνά στους παράγοντες μεταγραφής. Αυτή η διαμόρφωση πιθανολογεί τη λειτουργία του γονιδίου BRCA1 ως μεταγραφικό παράγοντα. Η δεύτερη περιοχή βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του γονιδίου. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει δύο αντίγραφα της καρβοξυτελικής περιοχής του γονιδίου BRCA1. Παρόμοιες περιοχές έχουν αναγνωρισθεί σε αρκετές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ή στην επιδιόρθωση του DNA, όπως η RAD9, η RAD4 η πρωτεΐνη 53BP1 και τρεις DNA-λιγάσες⁶²

Το γονίδιο BRCA2 αναγνωρίστηκε το 1995 μετά από μελέτες που συνέδεσαν μεταλλάξεις στη θέση q12-13 του χρωμοσώματος 13 με οικογενή καρκίνο του μαστού με μικρή ηλικία έναρξης. Το γονίδιο αυτό καταλαμβάνει 70 kb γονιδιακού DNA, έχει 27 εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 3418 αμινοξέα. Το γονίδιο BRCA2 συνδέεται απευθείας με την πρωτεΐνη RAD51, ένα ανθρώπινο ομόλογο του E. coli RecA γονιδίου, που φαίνεται να κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στην ανασύνδεση και επιδιόρθωση του DNA. Αντιθέτως, το γονίδιο

BRCA1 δε συνδέεται άμεσα με την πρωτεΐνη RAD51, παρόλο που έχουν περιγραφεί έμμεσες αλληλεπιδράσεις που υποδηλώνουν ότι είναι αρκετά πιθανό τα παράγωγα του γονιδίου BRCA1, του BRCA2 και η πρωτεΐνη RAD51 να εμπλέκονται σε ένα κοινό μονοπάτι ανταπόκρισης σε βλάβες του DNA και επιδιόρθωσής του.⁶³

Παθολογοανατομικά, οι περιπτώσεις καρκίνου του μαστού λόγω BRCA1 μετάλλαξης παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό μιτώσεων, εντονότερο πολυμορφισμό και κατατάσσονται κατά τη διάγνωση τους σε μεγαλύτερο στάδιο από τις αντίστοιχες περιπτώσεις σποραδικού καρκίνου. Επίσης, τα *in situ* καρκινώματα με BRCA1 μετάλλαξη είναι σπάνια, ενώ η παρουσία λεμφοκυττάρων εντός και πέριξ του όγκου είναι εντονότερη. Επιπροσθέτως παρατηρείται μεγάλη συχνότητα του μυελοειδούς υποτύπου, ο οποίος παρόλο που σχετίζεται με υψηλότερο στάδιο, φαίνεται ότι έχει καλύτερη πρόγνωση. Από βιολογικής πλευράς, τα νεοπλάσματα του μαστού σε έδαφος BRCA1 εμφανίζουν μικρότερη έκφραση των ορμονικών υποδοχέων, μεγαλύτερο βαθμό κακοήθειας, συχνότερες μεταλλάξεις στο p53, υψηλότερο δείκτη πολλαπλασιασμού και εμφανίζουν συχνότερα ανευπλοειδία.

Αντιθέτα, οι περιπτώσεις καρκίνου του μαστού σε έδαφος BRCA2 παρουσιάζουν λιγότερους σωληνώδεις σχηματισμούς και μειωμένη λεμφοκυτταρική διήθηση και παρουσιάζουν παρόμοιο αριθμό οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων με τα περιστατικά σποραδικής μορφής της νόσου.⁶⁴

Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε μια γυναίκα με μετάλλαξη στο γονίδιο BRCA1 κατά τη διάρκεια της ζωής κυμαίνεται από 65% έως 85%, ενώ στις γυναίκες με μετάλλαξη του BRCA2 από 45% έως 85%. Επίσης οι φορείς αυτοί διατρέχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών (40%-65% BRCA1, 10%-25% BRCA2) την ώρα που ο αντίστοιχος κίνδυνος στο γενικό πληθυσμό για τον

καρκίνο του μαστού είναι περίπου 10%, και για τον καρκίνο των ωθηκών είναι λιγότερο από 2%. Τέλος, και οι άρρενες φορείς των γονιδίων BRCA1 και BRCA2 διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη κακοήθειας, όπως καρκίνο μαστού, παγκρέατος και προστάτη.⁶⁵

Εκτός από τις μεταλλάξεις στα γονίδια **BRCA1 και BRCA2**, ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού περιλαμβάνει και ορισμένα σύνδρομα, καθένα από τα οποία σχετίζεται με ένα διαφορετικό γονίδιο. Το **σύνδρομο Cowden** αποτελεί ένα σπάνιο γενετικό σύνδρομο και είναι αποτέλεσμα μίας μετάλλαξης στο PTEN ογκοκατασταλτικό γονίδιο η οποία μεταβιβάζεται κατά τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολλαπλών αμαρτωμάτων και την εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού στους ασθενείς αυτούς κυμαίνεται μεταξύ 25% και 50%. Οι ασθενείς με αυτό το σύνδρομο συχνά παρουσιάζουν μακροκεφαλία, ινοκυστική νόσος του μαστού, λιπωμάτα και αδενώματα, πολύποδες του γαστρεντερικού σωλήνα, βρογχοκήλη, θηλωμάτωση των χειλέων και του στοματικού βλεννογόνου και ακάνθωση.⁶⁶

Μία διαφορετική επικρατούσα μετάλλαξη στο PTEN έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση του συνδρόμου **Bannayan-Riley-Ruvalcaba**, που χαρακτηρίζεται από πολυποειδή αμαρτώματα, μακροκεφαλία και νοητική καθυστέρηση και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού αλλά και του θυρεοειδούς αδένα.

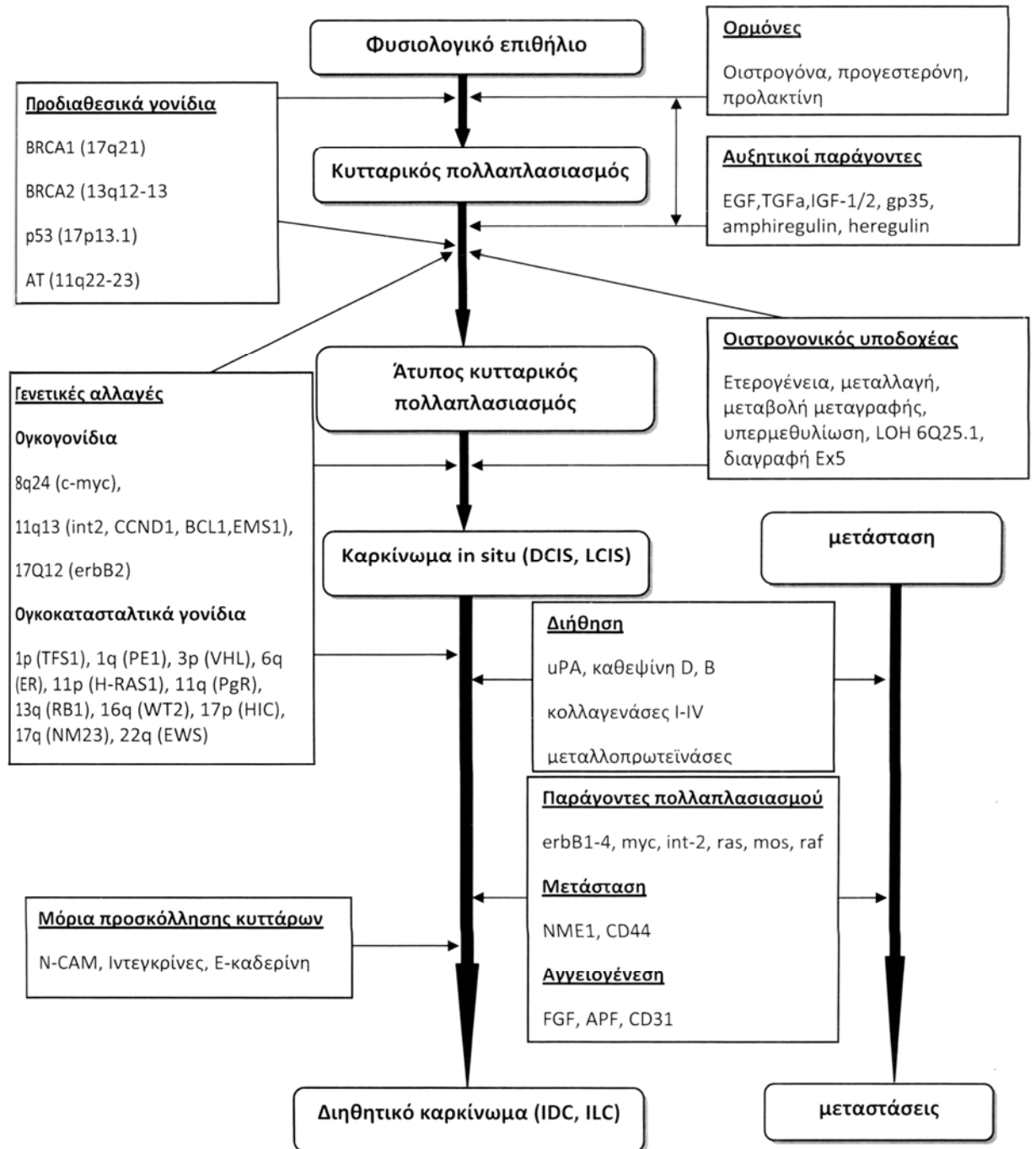
Το **σύνδρομο Li-Fraumeni** κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα. Τα μέλη της οικογένειας παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης σαρκώματος, καρκίνου του μαστού, όγκων του εγκεφάλου, καρκίνου των επινεφριδίων και καρκίνου όρχεων και ωθηκών. Ο καρκίνος του μαστού

αντιπροσωπεύει το ένα τρίτο των καρκίνων αυτών ενώ στο γενικό πληθυσμό, το σύνδρομο Li-Fraumeni ευθύνεται για λιγότερο από το 1% των νεοδιαγνωσθέντων καρκίνων του μαστού. Ο κίνδυνος ανάπτυξης κακοήθειας για τα μέλη της οικογένειας είναι 50% μέχρι την ηλικία των 30 και το 70% περίπου των ασθενών αυτών παρουσιάζουν μετάλλαξη στο ογκο-κατασταλτικό γονίδιο p53, ενώ ένας μικρός αριθμός ασθενών εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο CHK2, που ρυθμίζει το σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (cell cycle check point kinase 2). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν τη πιθανή ύπαρξη και μιας τρίτης γονιδιακής μετάλλαξης.⁶⁷

Το **σύνδρομο Peutz-Jeghers** οφείλεται σε μετάλλαξη στο STK11 ογκοκατασταλτικό γονίδιο και κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα. Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από αμαρτώματα του γαστρεντερικού σωλήνα και υπέρχρωση του στοματικού βλεννογόνου, του δέρματος και κυρίως των χειλέων και υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου, του παχέος εντέρου, του λεπτού εντέρου, του παγκρέατος, του θυρεοειδούς, του πνεύμονα και του ουροποιητικού συστήματος. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε αυτούς τους ασθενείς υπολογίζεται γύρω στο 30%.⁶⁸

Το σύνδρομο της **Αταξίας-Τηλαγγειεκτασίας** εκδηλώνεται με παρεγκεφαλιδική αταξία, ανοσοανεπάρκεια, υπερευαισθησία στην ακτινοβολία, τηλαγγειεκτασίες και χαρακτηρίζεται από αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας, όπως λευχαιμίας, λεμφώματος και καρκίνου του μαστού. Κληρονομείται με τον υπολειπόμενο αυτοσωματικό χαρακτήρα και οφείλεται σε μετάλλαξη στο ATM γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11q22 και είναι σημαντικό για την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο εάν οι ετεροζυγώτες φορείς του γονιδίου βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του μαστού.⁶⁷

Σχήμα 1. Μοντέλο της πολυβαθμιδωτής καρκινογένεσης στον καρκίνο του μαστού.⁶⁹



2. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΚΑΙ ΥΠΕΡΜΕΘΥΛΙΩΣΗ

Πέρα από τις γενετικές αλλοιώσεις που περιγράφηκαν, στην διαδικασία της καρκινογένεσης διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο και οι επιγενετικές μεταβολές οι οποίες δεν σχετίζονται με αλλαγές σε επίπεδο γονιδιακής αλληλουχίας (αλλαγή στην αλληλουχία του DNA) αλλά με λεπτές μοριακές τροποποιήσεις σε επίπεδο χρωματίνης και με μεταβολές της μετά-μετάφρασης στις ιστόνες, οι οποίες ορίζουν στα κύτταρα ποια γονίδια θα ενεργοποιηθούν ή θα κατασταλθούν μεταγραφικά. Η μεθυλίωση του DNA θεωρείται ένας από τους σπουδαιότερους επιγενετικούς βιολογικούς μηχανισμούς στον καρκίνο και η σχέση της με τον καρκίνο έχει φανεί από το 1983 ⁷⁰.

Η μεθυλίωση του DNA είναι μια χημική μετατροπή που οδηγεί στην προσθήκη μιας μεθυλομάδας (CH₃) στην 5'καρβόξυ θέση της κυτοσίνης. επηρεάζοντας την έκφραση των γονιδίων, επειδή το μεθυλωμένο DNA δεν μεταγράφεται. Οι περισσότερες μεθυλώσεις της κυτοσίνης συμβαίνουν στην περιοχή της αλληλουχίας 5' CG 3' (που καλείται CpG νησίδα), κάποιες ωστόσο αφορούν CpA και CpT δινουκλεοτίδια ^{71,72}. Οι CpG νησίδες είναι μικρές περιοχές του DNA, που κυμαίνονται από 0,5 με 5 kb και επαναλαμβάνονται κάθε 100kb ⁷³. Αυτές οι περιοχές είναι μη μεθυλωμένες, πλούσιες σε GC (60 με 70%) και έχουν αναλογία CpG με GpC τουλάχιστον 0,6 ^{74,75}. Γενικά, τα μισά από τα γονίδια του ανθρώπου έχουν CpG νησίδες οι οποίες εντοπίζονται στην περιοχή του υποκινητή τους ⁷⁶.

Η μεθυλίωση του DNA γίνεται από ειδικά ένζυμα τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMT). Οι γνωστότερες μέχρι σήμερα είναι οι DNMT1, 1b, 1o, 1p, 2, 3A, 3b και 3L. Η σημασία αυτών των ενζύμων έχει δειχθεί από πειράματα που έγιναν σε

ποντίκια, όπου τα ποντίκια με έλλειψη των γονιδίων των μεθυλοτρανσφερασών πέθαναν κατά την ανάπτυξη ή κατά τη γέννηση⁷⁷. Εκτός από τις μεθυλοτρανσφεράσες υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί που ελέγχουν τα επίπεδα μεθυλίωσης, όπως οι απομεθυλάσες, κέντρα μεθυλίωσης και κέντρα προστασίας από τη μεθυλίωση^{78,79}.

Η μεθυλίωση του DNA κατά μήκος του γονιδιώματος εξασφαλίζει τη χρωμοσωμική σταθερότητα, την αποφυγή χρωμοσωμικών μεταθέσεων και τη καταστολή της κινητικότητας των μεταθετονίων (ακολουθίες DNA που μετακινούνται σε διαφορετικές θέσεις μέσα στο γονιδίωμα προκαλώντας μεταλλάξεις). Όταν συμβαίνει σε νησίδια CpG που εντοπίζονται στους υποκινητές των γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική τους σιγή και την αναστολή έκφρασης της γενετικής πληροφορίας, διαδραματίζοντας βασικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση, την ανάπτυξη του εμβρύου, και στην απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος⁸⁰. Ωστόσο, η υπερμεθυλίωση νησιδίων CpG όταν συμβαίνει σε υποκινητές γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο, στη διόρθωση του DNA, στην αγγειογένεση, στο μηχανισμό της απόπτωσης, αλλά και ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορεί, μέσω της απενεργοποίησής τους, να οδηγήσει το κύτταρο σε νεοπλασματική εκτροπή^{81,82}.

Μέχρι σήμερα πολλά γονίδια έχουν βρεθεί να υπόκεινται σε υπερμεθυλίωση σε ασθενείς με καρκίνο. Στον ορθοκολικό καρκίνο, παραδείγματος χάριν, η περιοχή του εκκινητή του γονιδίου CDKN2A βρέθηκε να είναι υπερμεθυλιωμένη στο 61,1% των ασθενών⁸³. Σε άλλη μελέτη, μεθυλίωση του εκκινητή του γονιδίου p16 βρέθηκε στο 42% των περιπτώσεων ασθενών με καρκίνο του παχέως εντέρου και παρατηρήθηκε ότι είναι πιο συχνή στα στάδια C και D απ' ό,τι στα στάδια A και B, ενώ στον

καρκίνο των πνευμόνων έχουν βρεθεί αλλαγές στο μοτίβο της μεθυλίωσης σε περισσότερα από 40 γονίδια⁸⁴.

Πιο πρόσφατα, βρέθηκε ότι στον καρκίνο του μαστού παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG στην περιοχή του εκκινητή συγκεκριμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων όταν συγκριθούν με φυσιολογικά κύτταρα. Καθώς αυτά τα κύτταρα ρυθμίζουν φυσιολογικές λειτουργίες του κυτταρικού κύκλου και η μεθυλίωση αυτών των γονιδίων συνεισφέρει στη μεταφραστική σίγαση των γονιδίων, είναι πιθανό να παίζουν ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού⁸⁵. Γονίδια όπως το RASSF1A, το TWIST, το E-Cadherin, το GSTP1, το Cyclin D και το RAR-β2 έχουν πρόσφατα συνδεθεί με την παρουσία μετάστασης σε λεμφαδένες ενώ η παρουσία ότι η μεθυλίωση του DNA στα γονίδια APC και RASSF1A σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού, φαίνεται ότι αποτελεί μια ισχυρή, ανεξάρτητη προγνωστική παράμετρο⁸⁶.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο σε γυναίκες, παρά την πρόσφατη πτώση των ποσοστών θνησιμότητας από τη συγκεκριμένη νόσο, κυρίως λόγω της προόδου που έχει σημειωθεί στην έγκαιρη διάγνωση και στη βελτίωση της επικουρικής θεραπείας. Κακοί προγνωστικοί δείκτες θεωρούνται η καθυστερημένη διάγνωση, το υψηλό grade, το μεγάλο μέγεθος του όγκου και η ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων κατά τη διάγνωση¹. Ωστόσο, ακόμα και οι ασθενείς χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις κατά τον παθολογοανατομικό έλεγχο, παρουσιάζουν κίνδυνο υποτροπής της νόσου. Η ανεπαρκής ικανότητα του καθιερωμένου ελέγχου με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H&E) να εντοπίσει τις πιθανές λεμφαδενικές μικρομεταστάσεις θα μπορούσε να θεωρηθεί μια πιθανή εξήγηση². Ως εκ τούτου, η ανακάλυψη νέων μοριακών δεικτών που θα μπορούν να ανιχνεύσουν αποτελεσματικά τη κακοήθεια στους λεμφαδένες και να προβλέψουν το μεταστατικό δυναμικό και την πιθανότητα υποτροπής του καρκίνου του μαστού γίνεται επιτακτική^{2,3}.

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι η μετάσταση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί την ενεργοποίηση ή την αναστολή της έκφρασης πολλών διαφορετικών γονιδίων. Επιγενετικές αλλαγές, όπως η μεθυλίωση του DNA, θεωρούνται ότι συγκαταλέγονται στους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την πρωτεϊνική έκφραση μιας πληθώρας γονιδίων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση⁴. Όταν οι κυτοσίνες που βρίσκονται στις CpG νησίδες του προαγωγέα ενός γονιδίου μεθυλιώνονται, η δραστηριότητα των ρυθμιστικών πρωτεϊνών που προωθούν τη μεταγραφή του αναστέλλεται, οδηγώντας πρακτικά στη λειτουργική αδρανοποίηση του γονιδίου⁵.

Μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί μεθυλίωση σε πολλά γονίδια σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Τα περισσότερα από αυτά σχετίζονται με την απόπτωση, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση του DNA, την κυτταρική προσκόλληση και την κυτταρική επικοινωνία και τα ποσοστά της μεθυλίωσης ποικίλλουν ανάλογα με το γονίδιο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν προσελκύσει τα γονίδια RAR-β, Cyclin-D2 και Twist τα οποία είναι σημαντικοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και φαίνεται η μεθυλίωση τους να είναι εξαιρετικά σπάνια σε φυσιολογικό ιστό, ενώ είναι ιδιαίτερα συχνή σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού⁶. Το RAR-β είναι ένα γονίδιο στόχος για τους υποδοχείς του ρετινοειδούς. Δεσμεύει το ρετινοϊκό οξύ, δηλαδή τη βιολογικά δραστική μορφή της βιταμίνης Α, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του κυτταρικού σήματος, στην εμβρυϊκή οργανογένεση, στην κυτταρική ανάπτυξη και στη κυτταρική διαφοροποίηση⁷. Το γονίδιο Cyclin-D2 εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω της φωσφορυλίωσης και της απενεργοποίησης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (RB) και της ενεργοποίησης της Cyclin-E, διευκολύνοντας έτσι την μετάβαση του κυττάρου από την G1 στην S φάση⁸. Το TWIST κωδικοποιεί ένα παράγοντα μεταγραφής που ανήκει στην οικογένεια των βασικών helix-loop-helix πρωτεϊνών, οι οποίες ανταγωνίζονται την αποπτωτική δράση της πρωτεΐνης N-MYC, καταστέλλοντας τη πρωτεΐνη p19ARF και παρεμποδίζοντας έτσι τη λειτουργία της πρωτεΐνης p53⁹. Επιπρόσθετα, νεότερα στοιχεία δείχνουν ότι στην εξέλιξη και την μετάσταση του καρκίνου του μαστού, εμπλέκεται και το σύστημα «σηματοδότησης» των χημειοκινών CXCR4/CXCL12. Τα καρκινικά κύτταρα που προέρχονται από τον καρκίνο του μαστού και υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη CXCR4 έλκονται από κύτταρα που υπερεκφράζουν τη πρωτεΐνη CXCL12 στον πνεύμονα, στους λεμφαδένες, στο ήπαρ ή στα οστά και διευκολύνεται με αυτό το τρόπο η εξάπλωση τους. Επιπλέον, αρκετές νέες έρευνες

εστιάζονται στη συμμετοχή του γονιδίου caveolin-1 στην ανάπτυξη και την μετάσταση του καρκίνου του μαστού. Η οικογένεια του γονιδίου caveolin αποτελείται από τρεις ισομορφές οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταφοράς του κυτταρικού σήματος και φαίνεται να εμπλέκονται σε πολλές μοριακές αλληλεπιδράσεις σε κυτταρικό επίπεδο με συμμετοχή του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, του TGF (transforming growth factor), της πρωτεϊνικής κινάσης, του H-Ras και του c-erbB- 2 ¹⁰. Η πρωτεΐνη Caveolin-1 συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά άμεσα με πολλά βασικά μόρια «σηματοδότες», όπως κινάσες ενεργοποιημένες από μιτογόνο, την πρωτεϊνική κινάση C, το H-Ras, τους υποδοχείς EGF και την οικογένεια των κινασών της τυροσίνης (SRC). Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, κατέστη σαφές ότι η πρωτεΐνη caveolin-1 παίζει έναν βασικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου και τη μετάσταση λειτουργώντας με διττό ρόλο, άλλοτε ως ογκογονίδιο και άλλοτε ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο ανάλογα πιθανώς με το στάδιο του καρκίνου. Πρόσφατες αναλύσεις της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου μέσω sequencing έχουν δείξει ότι η μεθυλίωση του προαγωγέα του προκαλεί την αναστολή της μεταγραφής του. ¹¹

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Με αφορμή το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που έχει επικεντρωθεί τον τελευταίο καιρό στον κρίσιμο ρόλο των επιγενετικών αλλαγών, και ειδικά της μεθυλίωσης του DNA, κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης και συνυπολογίζοντας όλα τα παραπάνω, η παρούσα μελέτη εστίασε στο ερώτημα αν το προφίλ της μεθυλίωσης που βρίσκεται στον πρωτοπαθή όγκο χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα, ακόμη και μετά την διασπορά τους στους λεμφαδένες και αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός δείκτης ανίχνευσης της κακοήθειας όχι μόνο στον όγκο αλλά και στους λεμφαδένες και ως προγνωστικός δείκτης πρόβλεψης της μετάστασης και της υποτροπής.

Προς την κατεύθυνση αυτή, το προφίλ της μεθυλίωσης πέντε γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο και συγκεκριμένα των RAR-β, Cyclin-D2, Twist, CXCR4 και Caveolin-1 αναλύθηκε σε δείγματα από τον πρωτοπαθή όγκο 30 ασθενών με καρκίνο του μαστού, μαζί με τους αντίστοιχους θετικούς και αρνητικούς λεμφαδένες και σε δείγματα από 8 ινοαδενώματα μαστού (ομάδα έλεγχου) και συσχετίστηκε με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, και κυρίως με τη λεμφαδενική μετάσταση και την υποτροπή. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων CXCR4 και caveolin-1 στους πρωτοπαθείς όγκους και στους αντίστοιχους λεμφαδένες σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί περαιτέρω η συσχέτισή της μεθυλίωσης τους με την απουσία αντίστοιχης πρωτεϊνικής έκφρασης και ο ρόλος αυτής στην εξέλιξη και την μετάσταση του καρκίνου του μαστού.

Απώτερος σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να καλύψει τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά κενά, να ενισχύσει τις κλινικές παρατηρήσεις και να εμπλουτίσει τα πειραματικά δεδομένα πάνω στο ρόλο της υπερμεθυλίωσης των παραπάνω 5 γονιδίων στον καρκίνο του μαστού.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθησαν 30 ασθενείς με καρκίνο του μαστού που χειρουργήθηκαν στην Α΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Π.Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο» μεταξύ του Ιανουαρίου του 2001 και του Δεκεμβρίου του 2004. Τα χαρακτηριστικά όλων των ασθενών που συμπεριλαμβάνονται στην παρούσα μελέτη συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Μεταβλητή	Αριθμός (%)
Συνολικός Αριθμός	30 (100)
Ηλικία	54.3 (range:34- 75)
Εμμηνόπαυση	
Προεμμηνοπαυσιακές	11 (36.7)
Μετεμμηνοπαυσιακές	19 (63.3)
Ηλικία Εμμηνόπαυσης	47.9 (range: 40-55)
Ηλικία πρώτης ωορρηξίας	12.9 (range: 11-15)
Αριθμός τοκετών	1.7 (range: 0-4)
Ηλικία πρώτου τοκετού	24.5 (range 18-33)
Βαθμός διαφοροποίησης (grade)	
Στάδιο 1	3 (6.7)
Στάδιο 2	7 (23.3)
Στάδιο 3	20 (70)
Στάδιο κατά T	
T1	(10) 33
T2	(20) 67
Μέσο μέγεθος όγκου	2.41 (range 1-4)
Στάδιο κατά N	
N0	14 (46.7)
N1	9 (30)
N2	3 (10)
N3	4 (13.3)
TNM στάδιο	
1	7 (23.3)
2	16 (53,3)
3	7 (23.3)
Αριθμός εξαχθέντων λεμφαδένων	22.9 (15-37)
Αριθμός διηθημένων λεμφαδένων	7.46 (1-33)
Θετικό οικογενειακό ιστορικό	10 (33.3)
Είδος εγχείρησης	
Τροπ. Ριζική μαστεκτομή	23 (76.7)
Τμηματική μαστεκτομή	7 (23.3)
Επικουρική Θεραπεία	26 (86.9)
Υποτροπή	5 (16.6)
Θετικοί οιστρογονικοί υποδοχείς	18 (60)
Θετικοί προγεστερονικοί υποδοχείς	50 (15)
Θετική C-erb B2 χρώση	53.3 (16)
Θετική p53 χρώση	12 (40)

Τα δεδομένα για την ανοσοϊστοχημική έκφραση των υποδοχέων των οιστρογόνων (ER) της προγεστερόνης (PR) και των πρωτεϊνών C-erb B2 και p53 στον όγκο ανακτήθηκαν από τις ιστολογικές εκθέσεις των ασθενών, καθώς η ανοσοϊστοχημική τους χρώση περιλαμβάνεται στο καθιερωμένο πρωτόκολλο του παθολογοανατομικού τμήματος του νοσοκομείου μας για τον καρκίνο του μαστού. Όλοι οι ασθενείς είχαν επιβεβαιωμένο ιστολογικά T1 ή T2 πρωτοπαθές διηθητικό πορογενή καρκίνο του μαστού για τον οποίο πραγματοποιήθηκε χειρουργική επέμβαση. Τα κριτήρια αποκλεισμού ήταν: το αρσενικό φύλο, το μέγεθος του όγκου πάνω από 4 εκ, η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων, τα μη διηθητικά πορογενή καρκινώματα και η ύπαρξη πολυεστιακού καρκίνου στο μαστό. Επιπλέον δείγματα από οκτώ ινοαδενώματα του μαστού χωρίς ιστολογική ατυπία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Η ελάχιστη μετεγχειρητική παρακολούθηση ήταν 7 έτη (εύρος: 84 -138 μήνες, διάμεσος τιμή: 102 μήνες).

Δείγματα ιστών

Τα δείγματα από τον όγκο και τους αντίστοιχους θετικούς και αρνητικούς λεμφαδένες προήλθαν από εμβυθισμένους σε παραφίνη ιστούς που προήλθαν από το αρχείο του Παθολογοανατομικού Τμήματος του Π.Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο». Κατόπιν ελήφθησαν τομές από τα μπλογκ παραφίνης των όγκων και των αντίστοιχων λεμφαδένων του πρώτου μασχαλαίου επίπεδο. Για κάθε ασθενή χρησιμοποιήθηκε ένα μπλογκ από τον όγκο, ένα από τους θετικούς λεμφαδένες, όταν υπήρχε λεμφαδενική διήθηση, και ένα από τους αρνητικούς λεμφαδένες. Συγκεκριμένα από κάθε μπλοκ όγκου και θετικού λεμφαδένα ελήφθησαν τέσσερις τομές. Οι τομές 1 και 3 (5- μm η κάθε μια) χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA και οι

τομές 2 και 4 (2- μm η κάθε μια) για την ανοσοϊστοχημεία. Επτά τομές ελήφθησαν από το κάθε μπλοκ των αρνητικών λεμφαδένων. Οι τομές 2 και 5 (2- μm η κάθε μια) χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοϊστοχημεία και οι τομές 3 και 6 (5-μm η κάθε μια) για την απομόνωση του DNA. Οι τομές 1, 4 και 7 (2-μm η κάθε μια) βάφτηκαν με αιματοξυλίνη-ηωσίνη και εκτιμήθηκαν ξανά από έναν ανεξάρτητο παθολογοανατόμο, δεδομένου ότι έχει αποδειχθεί ότι οι τομές τριών επιπέδων μπορούν να αποκαλύψουν λεμφαδενικές μικρομεταστάσεις που διαφεύγουν της μονής H&E εξέτασης ^{87,88}. Τέσσερις διαδοχικές τομές (δύο των 5-μm και δύο των 2-μm) από τα αδενώματα χρησιμοποιήθηκαν επίσης για την εξαγωγή του DNA και την ανοσοϊστοχημική χρώση αντίστοιχα.

Εξαγωγή του DNA

Για την απομόνωση του DNA από τα μπλοκ παραφίνης χρησιμοποιήθηκε το oCheck® DNA Extraction Kit (Greiner Bio-One GmbH) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, δύο τομές των 5-μm από το κάθε μπλοκ αποπαραφινολογήθηκαν σε διάλυμα ξυλόλης και κατόπιν εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 96%. Ακολουθήθηκε η διαδικασία της κυτταρικής πέψης με τοποθέτηση κάθε δείγματος ιστού σε 350 μl διαλύματος λύσης το οποίο περιείχε 20 μl πρωτεϊνάσης K και 2,4 μl μεταφορικού DNA. Τα δείγματα επώαστηκαν για 45 λεπτά στους 56°C. Κατόπιν τα δείγματα υπέστησαν αδρανοποίηση στους 70°C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια το DNA κάθε δείγματος προσδέθηκε σε στήλη από την οποία εκπλύθηκε σε τελικό όγκο 80 μl. Από τον όγκο αυτό 8 μl χρησιμοποιήθηκαν για ηλεκτροφόρηση ώστε να υπολογιστεί η ολική ποσότητα DNA που εξήχθη ανά μπλοκ.

Μετατροπή με δισουλφιδικό νάτριο

Στη συνέχεια το DNA των δειγμάτων επώαστηκε με δισουλφιδικό νάτριο χρησιμοποιώντας το EpiTect® Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικότερα, για κάθε δείγμα προστέθηκε 1 µg DNA σε δισουλφιδικό νάτριο με ταυτόχρονη προσθήκη ύδατος ελεύθερου RNAάσης και DNA προστατευτικού διαλύματος (DNA protect buffer). Η προσθήκη του τελευταίου είναι αναγκαία για να αποφευχθεί το φαινόμενο του κατακερματισμού του DNA κατά τη μετατροπή του με δισουλφιδικό νάτριο. Επιπλέον διευκολύνει την αφυδάτωση του DNA και περιέχει μια χρωστική η οποία μεταβάλλεται ανάλογα με το pH ώστε να μπορεί να ελεγχθεί η ύπαρξη του κατάλληλου pH για την ολοκλήρωση της διαδικασίας.

Το τελικό μείγμα επώαστηκε σε αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Βήμα	Χρόνος	Θερμοκρασία
αφυδάτωση	5 λεπτά	95°C
επώαση	25 λεπτά	60°C
αφυδάτωση	5 λεπτά	95°C
επώαση	85 λεπτά	60°C
αφυδάτωση	5 λεπτά	95°C
επώαση	175 λεπτά	60°C
παραμονή	6 ώρες	20°C

Κατά τη διαδικασία της μετατροπής του DNA η μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη μετατρέπεται σε ουρακίλη ενώ η μεθυλιωμένη κυτοσίνη παραμένει αμετάβλητη. Με αυτόν το τρόπο προκύπτουν διαφορετικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων για το μεθυλιωμένο και το μη- μεθυλιωμένο DNA όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα

	Αρχική αλληλουχία	Μετά την μετατροπή με δισουλφιδικό νάτριο
μη-μεθυλιωμένο DNA	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N
μεθυλιωμένο DNA	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N

Το ποσοστό της μετατροπής της μη μεθυλιωμένης κυτοσίνης με την παραπάνω μέθοδο ξεπερνάει το 99%. Κατόπιν το DNA κάθε δείγματος προσδέθηκε σε στήλη από την οποία εκπλύθηκε σε τελικό όγκο 30 μl. Το σημαντικότερο στάδιο κατά την διάρκεια της έκπλυσης του DNA είναι η απομάκρυνση των ενώσεων του θείου που είχαν προστεθεί σε αυτό κατά τη διάρκεια της μετατροπής, το οποίο επιτυγχάνεται με τη προσθήκη του ειδικού διαλύματος BD (desulfonation buffer) που περιέχει υδροξείδιο του νατρίου.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδική για τη μεθυλίωση (MSP)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μια μέθοδος ενίσχυσης τμήματος ή τμημάτων DNA Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται, στην συνέχεια οι εκκινητές (ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά επιλεγμένου τμήματος της αλληλουχίας του DNA) υβριδίζονται με αυτές και επιμηκύνονται παρουσία της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης και των τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Στην πράξη,

30-40 κύκλοι αυτής της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA. Η τεχνική είναι εξαιρετικά επιλεκτική και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για την ενίσχυση μικροποσοτήτων DNA ή για να ανιχνεύσει την παρουσία συγκεκριμένων ακολουθιών DNA.

Οι εκκινητές για μεθυλιωμένο και μη μεθυλιωμένο DNA για τα γονίδια RAR-β, Cyclin D2, Twist, Caveolin-1 και CXCR4 που χρησιμοποιήθηκαν παραγγέλθηκαν από την Qiagen και παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Όνομασία υποκινητή	Αλληλουχία υποκινητή (5' → 3')	Μέγεθος (bp)	Θερμοκρασία υβριδισμού
U-RAR-β-F	GGATTGGGATGTTGAGAATGT	163	54°C
U-RAR-β-R	CAACCAATCCAACCAAAACAA		
M-RAR-β-F	GAACGCGAGCGATTTCGAGT	163	54°C
M-RAR-β-R	GACCAATCCAACCGAAACG		
U-Cyclin D2-F	AGAGTATGTGTTAGGGTTGATT	101	52°C
U-Cyclin D2-R	ACATCCTCACCAACCCTCCA		
M-Cyclin D2-F	GCGGATTTTTATCGTAGTCG	101	52°C
M-Cyclin D2-R	CTCCACGCTCGATCCTTCTTCG		
M-Twist-F	TTTGGATGGGGTTGTTATTGT	200	52°C
M-Twist-R	CCTAACCCAAACAACCAACC		
U-Twist-F	TTTCGGATGGGGTTGTTATC	200	57°C
U-Twist-R	AAACGACCTAACCCGAACG		
M-CXCR4-sense	CGCGTATTTTTTCGTTTCG	99	55°C
M-CXCR4-Antis	AATCGCCGCATACGCAGC		
U-CXCR4-sense	AAGTTGTGTATTTTTTGTTTTG	107	50°C
U-CXCR4-Antis	ACATACACAACACAAACCTCAC		
M-Caveolin-1-sense	GGTATTTTTGTAGGCGCGTC	208	55°C
M-Caveolin-1-Antis	CTAACAAACAAAAACGAAAAAGG		
U-Caveolin-1-sense	GTTTATATTGGGTATTTTTGTAGGTGTGT	230	59°C
U-Caveolin-1-Antis	TCCCCAAAATTCTAACAAAAACAAAAAAC		

Τα μεγέθη των μπάντων που προέκυψαν ήταν 163 bp για το RAR-β, 101 bp για το Cyclin D2, 200 bp για το Twist, 99 για το μεθυλιωμένο CXCR4, 107 bp για το μη μεθυλιωμένο CXCR4, 208 bp για το μεθυλιωμένο Caveolin-1, και 230 bp για το μη μεθυλιωμένο Caveolin-1.

Για το RAR-β, τη Cyclin D2, και το Twist το μείγμα που χρησιμοποιήθηκε για την PCR περιείχε ανά δείγμα 10 μl από το Epiect Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) το οποίο περιέχει την κατάλληλη συγκέντρωση του MgCl₂, 2 μl από κάθε υποκινητή σε αραιώση 1/20, 2 μl από το DNA που προέκυψε μετά την φάση της μετατροπής με δισουλφιδικό νάτριο, 0.2 μl από το διάλυμα πολυμεράσης HotStarTaq d-Tect και 4 μl ύδατος ελευθέρου RNάσης. Κατόπιν τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή και πολλαπλασιάστηκαν στις συνθήκες που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Βήμα	Χρόνος	Θερμοκρασία
Στάδιο ενεργοποίησης	10 λεπτά	95°C
Κύκλος 3 σταδίων		
αφυδάτωση	40 δευτερόλεπτα	94°C
υβριδισμός εκκινητών	30 δευτερόλεπτα	54°C για το RAR-β, 52 °C για το Cyclin D2 και το μεθυλιωμένο Twist και 57°C για το μη μεθυλιωμένο Twist.
επέκταση	45 δευτερόλεπτα	72°C
Τελική επέκταση	10 λεπτά	72°C

Για τη Caveolin-1 και το CXCR4 το μείγμα που χρησιμοποιήθηκε για την PCR περιείχε ανά δείγμα 2 μl από το CoralLoad PCR buffer (Qiagen, Hilden, Germany) το

οποίο περιέχει την κατάλληλη συγκέντρωση του $MgCl_2$, 2 μl από κάθε υποκινητή σε αραιώση 1/20, 1,5 μl νουκλεοτίδια (dNTPs) 1 μl από το DNA που προέκυψε μετά την φάση της μετατροπής με δισουλφιδικό νάτριο, 0.2 μl από το διάλυμα πολυμεράσης HotStarTaq d-Tect και 11.5 μl ύδατος ελευθέρου RNάσης. Κατόπιν τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή και πολλαπλασιάστηκαν στις συνθήκες που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Βήμα	Χρόνος	Θερμοκρασία
Στάδιο ενεργοποίησης	15 λεπτά	95°C
Κύκλος 3 σταδίων		
αφυδάτωση	30 δευτερόλεπτα	94°C για το
υβριδισμός εκκινητών	60 δευτερόλεπτα	55 °C για τα μεθυλιωμένα Cav-1 και το CXR4, 50 °C για το μη μεθυλιωμένο CXR4 και 59 °C για το μη μεθυλιωμένο Cav-1
επέκταση	60 δευτερόλεπτα	72°C
Τελική επέκταση	10 λεπτά	72°C

Ο κύκλος των 3 σταδίων επαναλαμβάνεται 37 φορές. Αρνητικοί μάρτυρες χωρίς DNA χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε PCR. Μεθυλιωμένο και μη μεθυλιωμένο ανθρώπινο DNA μετά την μετατροπή του με δισουλφιδικό χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας σε κάθε PCR. Κατόπιν τα δείγματα μεταφέρθηκαν και ηλεκτοφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2% που έχει χρωματιστεί με ethidium bromide (0.5 μg/ml).

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε από 2 βιολόγους υπό UV ακτινοβολία. Τα δείγματα που παρουσίασαν το πρότυπο μεθυλίωσης M/M ή M/U θεωρήθηκαν μεθυλιωμένα, ενώ τα δείγματα με το U /U μοτίβο αμεθυλιώτα.

Ανοσοϊστοχημεία

Οι τομές παραφίνης χρωματίστηκαν με αντίσωμα για την πρωτεΐνη CXCR4 (R&D Systems; MAB 172; αναλογία 1:75) και αντίσωμα για την πρωτεΐνη Caveolin-1 (Cell Signaling Technology; XP 3267; αναλογία 1:200), χρησιμοποιώντας το σύστημα Dako REAL EnVision Detection System Peroxidase/DAB1 (Dako; K5007) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Οι τομές υποβλήθηκαν σε ανάκτηση αντιγόνου με μικροκύματα (10 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος 0.1M, pH 6) πριν επωαστούν όλη τη νύκτα στους 40C με το πρωτογενές αντίσωμα. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τομές στις οποίες παραλήφθηκε το πρωτογενές αντίσωμα. Για τη πρωτεΐνη caveolin-1, τα ενδοθηλιακά κύτταρα θεωρήθηκαν εσωτερικός θετικός μάρτυρας, διότι αυτά τα κύτταρα εκφράζουν πάντα τη πρωτεΐνη caveolin-1⁸⁹. Τα δείγματα στη συνέχεια χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη και τα πλακίδια εκπλύθηκαν μεταξύ των σταδίων με 1xPBS.

Αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημείας

Όλα τα πλακίδια αξιολογήθηκαν από δύο ανεξάρτητους παθολογοανατόμους, που δε γνώριζαν τα χαρακτηριστικά των ασθενών. Ένας αριθμός από 1000 κύτταρα

αξιολογήθηκαν σε 10 πεδία (400 χ μεγέθυνση) για να αξιολογηθεί το ποσοστό θετικό κυττάρων. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση αξιολογήθηκε ως εξής: αρνητική έκφραση (-), χαμηλή έκφραση (+) όταν το ποσοστό θετικό κυττάρων ήταν 1-20%, μέτρια έκφραση (++) όταν το ποσοστό αυτό ήταν 21-50% και υψηλή (+++) όταν το ποσοστό θετικό κυττάρων ήταν > 51 %. Για το caveolin-1 η χρώση στα καρκινικά κύτταρα του όγκου (ΚΚ) και στο στρώμα (Σ) αξιολογήθηκαν ξεχωριστά, διότι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο ρόλος της έκφρασης του είναι διαφορετικός στα δύο ήδη κυττάρων⁸⁹

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των ποσοτικών μεταβλητών. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων αναλύθηκαν με Mann-Whitney U test ή χ^2 τεστ και θεωρήθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικές όταν η τιμή p ήταν <0,05. Το είδος και το μέγεθος της γραμμικής σχέσης μεταξύ των μοτίβων μεθυλίωσης και της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης εκτιμήθηκε με τον συντελεστή συσχέτισης του Pearson (Pearson's coefficient of correlation). Η ανάλυση της επιβίωσης ελεύθερης νόσου διενεργήθηκε με την εφαρμογή της μεθόδου Kaplan-Meier και του μη παραμετρικού στατιστικού ελέγχου log-rank. Επιπλέον, για τον υπολογισμό της ευαισθησίας και της ειδικότητας των μελετούμενων μοριακών δεικτών στην ανίχνευση της κακοήθειας εκτελέστηκε ανάλυση καμπύλης ROC (receiver operating characteristic curve analysis) και οι αντίστοιχες περιοχές κάτω από την καμπύλη (AUC) υπολογίστηκαν. Τιμή της AUC κοντά στο 1.0 σημαίνει ισχυρή προγνωστική αξία των αποτελεσμάτων, ενώ από την άλλη πλευρά, μια τιμή της AUC κοντά στο 0.5

δεν έχει προγνωστική αξία. Η ευαισθησία υπολογίστηκε ως: αριθμός των αληθών θετικών αποτελεσμάτων / (αριθμός των αληθών θετικών + αριθμός των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων) και η ειδικότητα ως: αριθμό αληθώς αρνητικών αποτελεσμάτων / (αριθμός αληθώς αρνητικών + αριθμός ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων). Ένα αποτέλεσμα ταξινομήθηκε ως αληθώς ή ψευδώς θετικό ή αρνητικό ανάλογα με την ύπαρξη συμφωνίας ανάμεσα στην μεθυλίωση του δείγματος και την παρουσία ή απουσία κακοήθειας στην έκθεση του παθολογοανατόμου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η συχνότητα της υπερμεθυλίωσης του DNA στον όγκο και στους μάρτυρες.

Η δοκιμασία MSP χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της κατάστασης μεθυλίωσης των γονιδίων RAR-β, cyclin D2, Twist, CXCR4 και Caveolin-1 σε 30 δείγματα προερχόμενα από καρκίνο του μαστού και σε 8 δείγματα από αδενώματα μαστού. Το RAR-β βρέθηκε μεθυλιωμένο στο 90% των όγκων. Μερική μεθυλιωμένη (M/U) υπήρχε στο 73,3% των περιπτώσεων. Το cyclin D2 ήταν επίσης μεθυλιώνεται σε αρκετά υψηλή συχνότητα (96,7%) στα δείγματα από καρκίνο. Το μοτίβο M/M εντοπίστηκε στο 46,7% των δειγμάτων και το μοτίβο M/U στο υπόλοιπο 50%. Ομοίως, η παρουσία μεθυλίωσης για το Twist ανιχνεύθηκε στο 93,3% των όγκων, με το μοτίβο M/M να εντοπίζεται στο 30% των εξεταζόμενων όγκων. Αν και αμφότερα μεθυλιωμένα και μη μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια CpG ανιχνεύθηκαν στους όγκους, παρατηρήθηκε καθολική έλλειψη μεθυλίωσης των γονιδίων RAR-β, cyclin D2 και Twist στην ομάδα ελέγχου ($p < 0,001$ και για τα τρία γονίδια).

Τα γονίδια CXCR4 και caveolin-1 ήταν επίσης υπερμεθυλιωμένα σε υψηλή συχνότητα στα δείγματα των όγκων. Η MSP έδειξε ότι το 96,7% των όγκων παρουσίαζαν υπερμεθυλίωση στον υποκινητή του CXCR4, ενώ ένα μίγμα μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων θραυσμάτων (μοτίβο M/U) ανιχνεύθηκε στο 60% των περιπτώσεων. Το γονίδιο Caveolin-1 ήταν μεθυλιωμένο στο 86,7% των όγκων, παρουσιάζοντας το προφίλ M/U στο 63,3% των περιπτώσεων. Όλα τα αδενώματα μαστού που χρησιμοποιήθηκαν σαν ομάδα ελέγχου στην παρούσα μελέτη παρουσίαζαν υπερμεθυλίωση του γονιδίου caveolin-1 με το M/U μοτίβο να ανιχνεύεται στα μισά ($n = 4$), ενώ το 75% των αδενωμάτων ήταν επίσης

υπερμεθυλιωμένο στην περιοχή του προαγωγέα του CXCR4, με το M/U μοτίβο να εντοπίζεται στο 50% εξ' αυτών (n = 3).

Η συχνότητα της υπερμεθυλίωσης του DNA στους μεταστατικούς λεμφαδένες.

Από το σύνολο των ασθενών οι 16 παρουσίαζαν λεμφαδενική διήθηση. Η MSP ανάλυση ανιχνεύει υψηλά ποσοστά υπερμεθυλίωσης και για τα πέντε γονίδια που μελετήθηκαν. Το RAR-β βρέθηκε μεθυλιωμένο στο 68,8% των θετικών λεμφαδένων ενώ μοτίβο M/M ανιχνεύτηκε στο 12,5% αυτών. Στο 81,2% των θετικών λεμφαδένων το μοτίβο μεθυλίωσης που ανιχνεύτηκε ήταν ίδιο με αυτό του όγκου. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν για το Cyclin D2 και το Twist. Η υπερμεθυλίωση και για τα δύο γονίδια ήταν παρούσα στο 87,5% των περιπτώσεων, με μια υπεροχή του προφίλ M/M (50% και 62,5% αντίστοιχα). Ομοιότητα στο προφίλ της μεθυλίωσης μεταξύ των θετικών λεμφαδένων και του όγκου υπήρχε στο 68,8% των ασθενών για το Cyclin D2 και στο 87,5% των ασθενών για το Twist. Ο υποκινητής του γονιδίου CXCR4 βρέθηκε επίσης υπερμεθυλιωμένος στο 93,8% των θετικών λεμφαδένων. Απουσία μη μεθυλιωμένου γονιδίου (M/M προφίλ) βρέθηκε στο 12,5% των περιπτώσεων. Αντιστοιχία μεταξύ των προφίλ μεθυλίωσης του διηθημένου λεμφαδένα και την αντίστοιχη πρωτογενή βλάβη εντοπίστηκε στο 87,5% των περιπτώσεων. Όλοι οι θετικοί λεμφαδένες παρουσίαζαν υπερμεθυλίωση για το γονίδιο caveolin-1, ενώ στο 43,8% των περιπτώσεων η μεθυλίωση ήταν καθολική (μοτίβο M/M). Η ομοιότητα του προφίλ μεθυλίωσης ανάμεσα στους θετικούς λεμφαδένες και στην πρωτογενή εστία ήταν 81,3%.

Η συχνότητα της υπερμεθυλίωσης του DNA στους μη διηθημένους λεμφαδένες.

Όλοι οι αρνητικές λεμφαδένες στην παρούσα μελέτη επαναξιολογήθηκαν με τη λήψη τριών επιπλέον τομών για να αποφευχθεί ένα ιστολογικώς ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας δεν εντοπίστηκε νεοπλασματική διήθηση σε κανένα από τα 27 μπλοκ των αρνητικών λεμφαδένων. Η MSP ανάλυση έδειξε υπερμεθυλίωση για τα γονίδια RAR-β, Cyclin D2 και Twist στο 50%, 63% και 70,3% των περιπτώσεων αντίστοιχα, σε ποσοστά δηλαδή λίγο χαμηλότερα από αυτά που καταγράφηκαν για τους θετικούς λεμφαδένες, χωρίς αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Κανένας από τους αρνητικούς λεμφαδένες δεν παρουσίασε το μοτίβο M/M για το γονίδιο RAR-β. Όσον αφορά το μοτίβο M/M για την Cyclin D2 και το Twist αυτό παρατηρήθηκε στο 29,7% και 48,1% των περιπτώσεων αντίστοιχα. Η συχνότητα της συμφωνίας για τα μοτίβα μεθυλίωσης μεταξύ πρωτογενούς βλάβης και αντίστοιχων αρνητικών λεμφαδένων ήταν 63% για το RAR-β, 48,1% για τη Cyclin D2 και 74,1% για το Twist. Όλοι οι ασθενείς που έφεραν το μοτίβο U/U στον όγκο για οποιαδήποτε από τα προηγούμενα τρία γονίδια, παρουσίασαν αντίστοιχα το ίδιο μοτίβο στους θετικούς και τους αρνητικούς λεμφαδένες (n = 6). Παρομοίως, για όλους τους θετικούς λεμφαδένες με πλήρη απουσία μεθυλίωσης για τα παραπάνω τρία γονίδια η ίδια εικόνα μεθυλίωσης παρουσιάστηκε και στους αρνητικούς λεμφαδένες (n = 9)

Το προφίλ U/U δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα αρνητικό λεμφαδένα ούτε για το γονίδιο CXCR4 ούτε για το caveolin-1. Επιπλέον το M/M προφίλ για το γονίδιο CXCR παρατηρήθηκε στο 55% των αρνητικών λεμφαδένων. Η MSP ανάλυση για το γονίδιο caveolin-1 έδειξε συχνότητα 100% του προφίλ M/U στους αρνητικούς λεμφαδένες, ποσοστό σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με τον όγκο ή τους θετικούς λεμφαδένες

(p = 0,02). Η ομοιότητα των προφίλ μεθυσίωσης ανάμεσα στη πρωτογενή βλάβη και το αρνητικό λεμφαδένα για τα CXCR4 και caveolin-1 ήταν 55,6% και 63% αντίστοιχα.

Τα ποσοστά μεθυσίωσης στον όγκο και τους αντίστοιχους λεμφαδένες συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

	RAR-β			Cyclin D2			Twist			CXCR4			Caveolin-1		
	M/M	M/U	U/U	M/M	M/U	U/U	M/M	M/U	U/U	M/M	M/U	U/U	M/M	M/U	U/U
Όγκος	16.7	73.3	10.0	46.7	50	29.7	63.3	30.0	6.7	36.7	60	3.3	23.3	63.4	13.3
Θετικός λεμφαδένας	12.5	56.2	31.2	50.0	37.5	33.3	62.5	25.0	12.5	12.5	81.3	6.2	37.5	62.5	0
Αρνητικός λεμφαδένας	10.0	40.0	50.0	3.3	12.5	37.0	48.1	22.2	29.6	63	37	0	0	100	0

Αναλυτικά τα μοτίβα μεθυσίωσης για τα γονίδια RAR-β, Cyclin D2 και Twist στα δείγματα από τους όγκους, τους θετικούς λεμφαδένες και τους αρνητικούς λεμφαδένες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Ασθενείς	RAR-β			Cyclin D2			Twist		
	Όγκος	Θ.Λ	Α.Λ	Όγκος	Θ.Λ	Α.Λ	Όγκος	Θ.Λ	Α.Λ
1	M/M	M/M	N3	M/M	M/M	N3	M/M	M/M	N3
2	M/U	M/U	M/U	M/U	M/U	M/U	M/M	M/M	M/U
3	M/U	M/M	N3	M/M	M/M	N3	M/U	M/U	N3
4	M/U	M/U	N3	M/U	M/M	N3	M/M	M/U	N3
5	M/U	U/U	U/U	M/M	U/U	U/U	M/M	M/M	M/M
6	M/U	M/U	M/U	M/U	U/U	U/U	U/U	U/U	U/U
7	M/M	M/U	U/U	M/M	M/M	M/M	M/U	M/U	M/U
8	M/U	M/U	M/U	M/M	M/U	U/U	M/M	M/M	M/M
9	M/U	M/U	M/U	M/M	M/U	M/U	M/M	M/M	U/U
10	M/U	M/U	M/U	M/M	M/M	M/U	M/U	M/U	M/U
11	U/U	U/U	U/U	M/U	M/U	M/U	M/U	M/U	M/U
12	U/U	U/U	U/U	M/M	M/M	M/U	M/M	U/U	U/U
13	M/U	M/U	U/U	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M
14	M/U	U/U	U/U	M/U	M/U	U/U	M/M	M/M	M/M
15	M/U	U/U	U/U	M/U	M/U	M/U	M/M	M/M	M/M
16	M/U	M/U	M/U	M/M	M/M	M/M	M/M	M/M	U/U
17	M/U	N0	M/U	M/M	N0	M/U	M/M	N0	M/M
18	M/M	N0	U/U	M/U	N0	U/U	M/M	N0	M/M
19	M/U	N0	M/U	M/U	N0	U/U	M/M	N0	M/M
20	M/U	N0	M/U	M/U	N0	M/U	M/U	N0	U/U
21	M/U	N0	M/U	M/U	N0	U/U	M/U	N0	M/U
22	M/U	N0	M/U	M/M	N0	M/M	M/M	N0	M/M
23	M/U	N0	M/U	M/M	N0	M/M	M/M	N0	M/M
24	M/U	N0	M/U	M/M	N0	M/U	U/U	N0	U/U
25	M/U	N0	U/U	U/U	N0	U/U	M/U	N0	M/U
26	M/U	N0	M/U	M/M	N0	M/M	M/U	N0	U/U
27	M/M	N0	U/U	M/M	N0	U/U	M/M	N0	U/U
28	M/M	N0	M/U	M/M	N0	M/M	M/M	N0	M/M
29	M/U	N0	U/U	M/M	N0	M/U	M/M	N0	M/M
30	U/U	N0	U/U	M/U	N0	M/U	M/M	N0	M/M

Συσχέτιση του προφίλ μεθυσίωσης με την πρωτεϊνική έκφραση των γονιδίων CXCR4 και caveolin-1.

Θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για το CXCR4 παρατηρήθηκε στο 63,3% των όγκων, στο 87,5% των θετικών λεμφαδένων και στο 44,4% των αρνητικών λεμφαδένων. Σε όλες τις περιπτώσεις που παρουσιάστηκε το M/M προφίλ μεθυσίωσης (n = 11), παρατηρήθηκε απουσία χρώσης για το CXCR4 (p <0,001). Αντίθετα, ισχυρή έκφραση του γονιδίου CXCR4 ανιχνεύθηκε στα δείγματα που χαρακτηρίζονταν από το U/U μοτίβο μεθυσίωσης. Τα δείγματα με το μοτίβο M/U συνήθως παρουσίαζαν μέτρια ή χαμηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση, η οποία και καταγράφηκε στο 76,5% των όγκων, το 92,3% των θετικών λεμφαδένων και το 83,3% των αρνητικών λεμφαδένων. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι όταν υπερμεθυσιώνεται ο υποκινητής του CXCR4 η πρωτεϊνική έκφραση αναστέλλεται (p<0.001, r=0.949).

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του Caveolin-1 επίσης συσχετίστηκε με το προφίλ μεθυσίωσης σε πρωτογενείς βλάβες, θετικούς και αρνητικούς λεμφαδένες με εξαίρεση ένα από τους 7 θετικούς λεμφαδένες με προφίλ M/M (14,3%) που έδειξε ένα χαμηλό δείκτη ανοσοαντιδραστικότητας (p<0.001). Θετική έκφραση παρατηρήθηκε στο 76,7% των πρωτογενών βλαβών με το 40% των ασθενών να παρουσιάζουν ανοσοθετικότητα του caveolin-1 σε καρκινικά κύτταρα όγκου και το 66,6% των ασθενών σε στρώμα κύτταρα όγκου. Τα ποσοστά ανοσοθετικότητας στους θετικούς και αρνητικούς λεμφαδένες ήταν 62,5% και 100% αντίστοιχα. Κανένα δείγμα από την ομάδα έλεγχου δεν παρουσίασε έκφραση του caveolin-1. Το M/U μοτίβο συνοδευόταν κυρίως από χαμηλό δείκτη ανοσοαντιδραστικότητας στους όγκους και στους μεταστατικούς λεμφαδένες (94,7% και 88,9%, αντίστοιχα). Αυτά τα

αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η μεθυλίωση στις CpG νησίδες του υποκινητή του caveolin-1 συνοδεύεται από αναστολή της έκφρασης του ($p < 0,001$, $r = 0,663$).

Αναλυτικά τα μοτίβα μεθυλίωσης για τα γονίδια CXCR4 και caveolin-1 στα δείγματα από τους όγκους, τους θετικούς λεμφαδένες και τους αρνητικούς λεμφαδένες και η αντίστοιχη ανοσοιστοχημική τους έκφραση φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

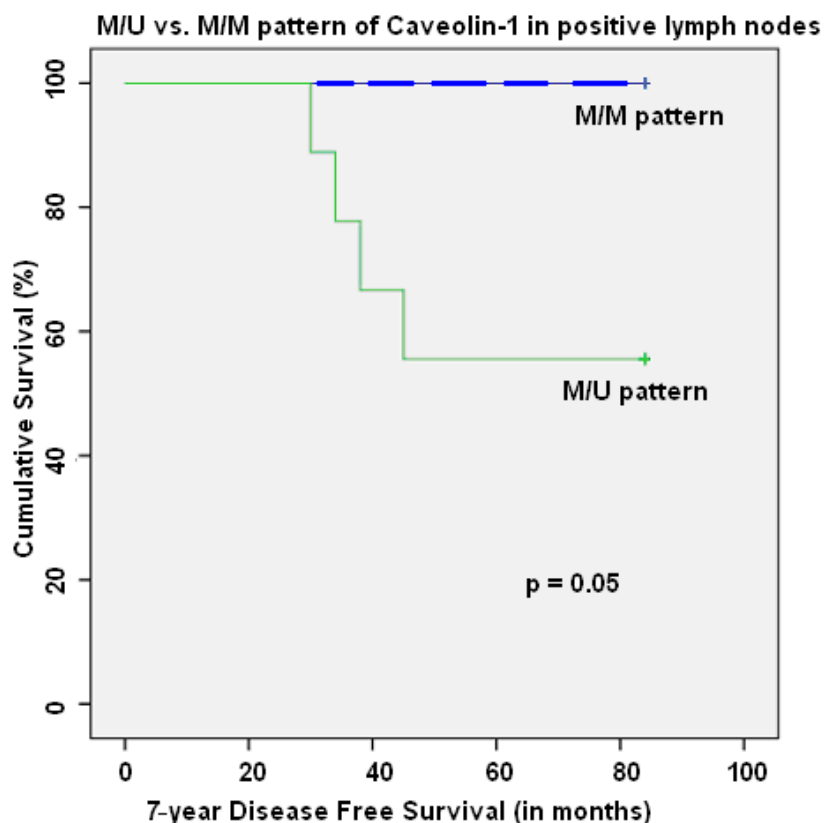
Patient	CXCR4						Caveolin-1							
	MSP			IHC			MSP			IHC				
	Όγκος	Θ.Λ.	Α.Λ	Όγκος	Θ.Λ.	Α.Λ	Όγκος	Θ.Λ.	Α.Λ	Όγκος	ΚΚ	Σ	Θ.Λ.	Α.Λ
1	M/U	M/U	N3	+	+	N3	U/U	M/U	N3	+	-	+	+	N3
2	M/U	M/U	M/M	+	+	-	M/U	M/M	M/U	+	-	+	-	+
3	M/U	M/U	N3	+	+	N3	M/U	M/U	N3	+	+	+	+	N3
4	M/U	M/U	N3	+	+	N3	M/U	M/U	N3	++	++	++	+	N3
5	M/U	M/U	M/U	+	+	+	M/M	M/M	M/U	-	-	-	-	++
6	M/U	M/U	M/U	+	+	+	M/U	M/U	M/U	+	+	+	+	++
7	M/M	M/M	M/M	-	-	-	M/M	M/M	M/U	-	-	-	+	++
8	M/U	M/U	M/M	++	+	-	M/M	M/M	M/U	-	-	-	-	+
9	M/U	M/U	M/M	+	+	-	M/U	M/U	M/U	+	+	+	+	+
10	M/U	M/U	M/M	+	+	-	M/U	M/U	M/U	+	+	-	++	++
11	M/U	M/U	M/U	++	+	+	M/U	M/U	M/U	+	+	-	+	++
12	M/U	M/U	M/U	+	++	+	M/M	M/M	M/U	-	-	-	-	++
13	M/U	M/U	M/U	+	+	+	M/M	M/M	M/U	-	-	-	-	+
14	U/U	M/U	M/U	+++	+	+	M/U	M/U	M/U	+	-	+	+	+
15	M/M	M/M	M/M	-	-	-	M/M	M/M	M/U	-	-	-	-	+
16	M/U	U/U	M/M	+	+++	-	M/M	M/U	M/U	-	-	-	+	++
17	M/U	N0	M/U	+	N0	+	U/U	N0	M/U	++	-	++	N0	++
18	M/M	N0	M/M	-	N0	-	M/U	N0	M/U	+	-	++	N0	+
19	M/U	N0	M/U	++	N0	+	M/U	N0	M/U	+	+	+	N0	+
20	M/U	N0	M/M	+	N0	-	M/U	N0	M/U	+	-	+	N0	+
21	M/M	N0	M/M	-	N0	-	M/U	N0	M/U	+	+	+	N0	++
22	M/U	N0	M/M	+	N0	-	U/U	N0	M/U	+	-	++	N0	++
23	M/M	N0	M/U	-	N0	++	M/U	N0	M/U	+	+	+	N0	+
24	M/M	N0	M/U	-	N0	+	M/U	N0	M/U	+	-	+	N0	+
25	M/M	N0	M/M	-	N0	-	M/U	N0	M/U	+	-	+	N0	++
26	M/M	N0	M/U	-	N0	++	U/U	N0	M/U	+	-	+	N0	+
27	M/M	N0	M/M	-	N0	-	M/U	N0	M/U	+	-	+	N0	+
28	M/U	N0	M/M	++	N0	-	M/U	N0	M/U	+	+	+	N0	+
29	M/M	N0	M/M	-	N0	-	M/U	N0	M/U	+	+	-	N0	++
30	M/M	N0	M/U	-	N0	+	M/U	N0	M/U	+	+	+	N0	++

ΚΚ: καρκινικά κύτταρα στον όγκο Σ: στρωματικά κύτταρα στον όγκο

Συσχέτιση της μεθυλίωσης με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Κλινικές παράμετροι όπως η ηλικία, η εμμηνόπαυση, η ηλικία έναρξης της εμμηνόπαυσης, η ηλικία του πρώτου τοκετού, ο αριθμός των τοκετών, το οικογενειακό ιστορικό, ο βαθμός διαφοροποίησης και το μέγεθος του όγκου δεν συσχετίστηκαν στατιστικά σημαντικά με το προφίλ μεθυλίωσης του υποκινητή οποιοδήποτε από τα γονίδια που μελετήθηκαν.

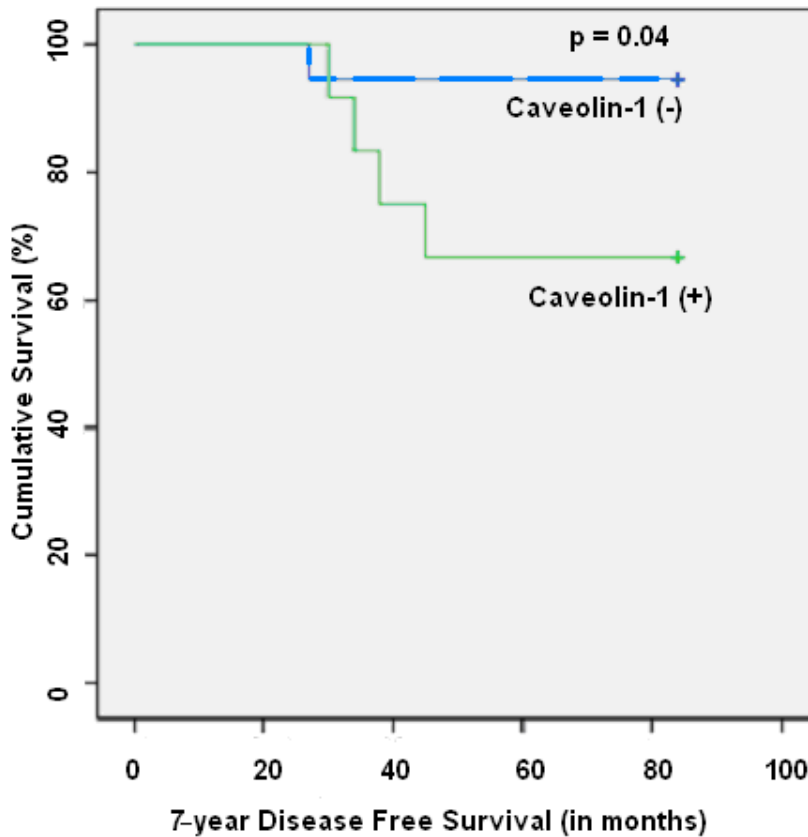
Το M/M μοτίβο μεθυλίωσης του γονιδίου CXCR4 στον όγκο παρουσιάστηκε πιο συχνά σε ασθενείς χωρίς λεμφαδενική μετάσταση σε σύγκριση με ασθενείς που είχαν διηθημένους λεμφαδένες κατά τη διάγνωση (64,2% έναντι 12,5%, $p = 0,04$). Σε αντίθεση το μοτίβο μεθυλίωσης M/M του γονιδίου caveolin-1 στον όγκο δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τους ασθενείς χωρίς λεμφαδενική διήθηση ενώ βρέθηκε στο 43,8% των ασθενών με λεμφαδενικές μεταστάσεις ($p = 0,006$). Επιπλέον, αυτό το συγκεκριμένο μοτίβο μεθυλίωσης ήταν πιο συχνό στους p53 (+) ασθενείς σε σύγκριση με τους p53 (-) ασθενείς (50% έναντι 13,3%, $p = 0,04$). Όταν η επταετής επιβίωση χωρίς νόσο (disease-free survival) εξετάστηκε σε σχέση με το προφίλ μεθυλίωσης μόνο το M/U μοτίβο του caveolin-1 στο θετικό λεμφαδένα συσχετίστηκε με σημαντικά μειωμένο ποσοστό επταετούς επιβίωση χωρίς νόσο (55,6% έναντι 100% , $p = 0,05$), όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα:



Ανοσοιστοχημική έκφραση και κλινικοπαθολογικές παραμέτροι

Η υψηλή έκφραση του CXCR4 σε δείγματα προερχόμενα από όγκους ασθενών συσχετίστηκε με PR θετική χρώση (100% έναντι 41,6%, $p = 0,04$), ενώ η έλλειψη της έκφραση του caveolin-1 στο στρώμα του όγκου συνδέθηκε με λεμφαδενική μετάσταση (90% έναντι 35%, $p = 0,006$). Η έκφραση του Caveolin-1 στα καρκινικά κύτταρα του όγκου σχετίστηκε με απουσία έκφρασης του p53 (90% έναντι 53,3%, $p = 0.04$). Επιπλέον, η έκφραση του caveolin-1 στα καρκινικά κύτταρα του όγκου βρέθηκε να είναι ισχυρός προγνωστικός δείκτης, δεδομένου ότι αυτή η ομάδα των ασθενών παρουσιάζει μια σημαντικά ελαττωμένη επταετή χωρίς νόσο επιβίωση σύγκριση με ασθενείς χωρίς έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου στα καρκινικά κύτταρα του όγκου caveolin-1 (66,7% έναντι 94,4%, $p = 0.04$)

Caveolin-1 expression in breast cancer cells and Disease Free Survival



Αξιολόγηση της μεθυλίωσης ως διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση της κακοήθειας στο μαστό και στους μασχαλιαίους λεμφαδένες

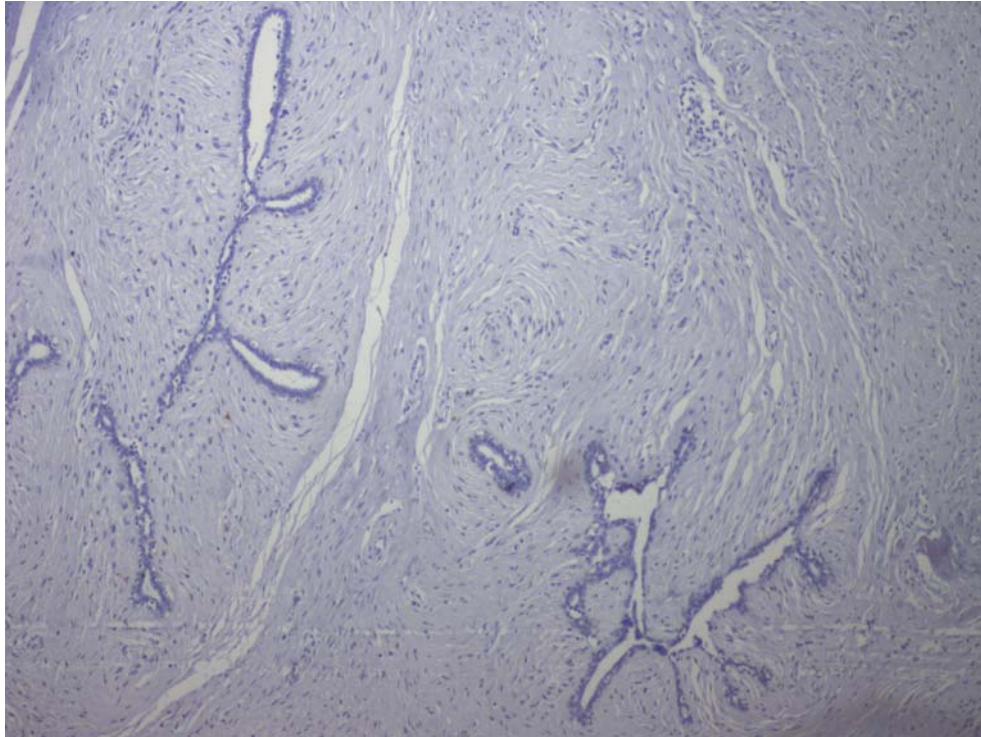
Τα γονίδια RAR-β, cyclin D2 και Twist αξιολογήθηκαν επίσης ως δείκτες ανίχνευσης του καρκίνου και της λεμφαδενική μετάστασης λόγω της καθολικής απουσίας της μεθυλίωσης των παραπάνω γονιδίων στα αδενώματα. Όλοι οι ασθενείς είχαν τουλάχιστον δύο από αυτά τα τρία γονίδια μεθυλιωμένα στους όγκους τους. Συνεπώς μεθυλίωση δύο οποιωνδήποτε γονιδίων της τριάδας RAR-β, cyclin D2 και Twist

μπορεί να ανιχνεύσει κακοήθεια σε εξεταζόμενο ιστό προερχόμενο από μαστό με ευαισθησία και ειδικότητα 100% (AUC 1.000). Αντίθετα, τα υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης των γονιδίων CXCR4 και caveolin-1 στα αδενώματα δεν επιτρέπουν την χρήση τους ως δείκτες ανίχνευσης της κακοήθειας.

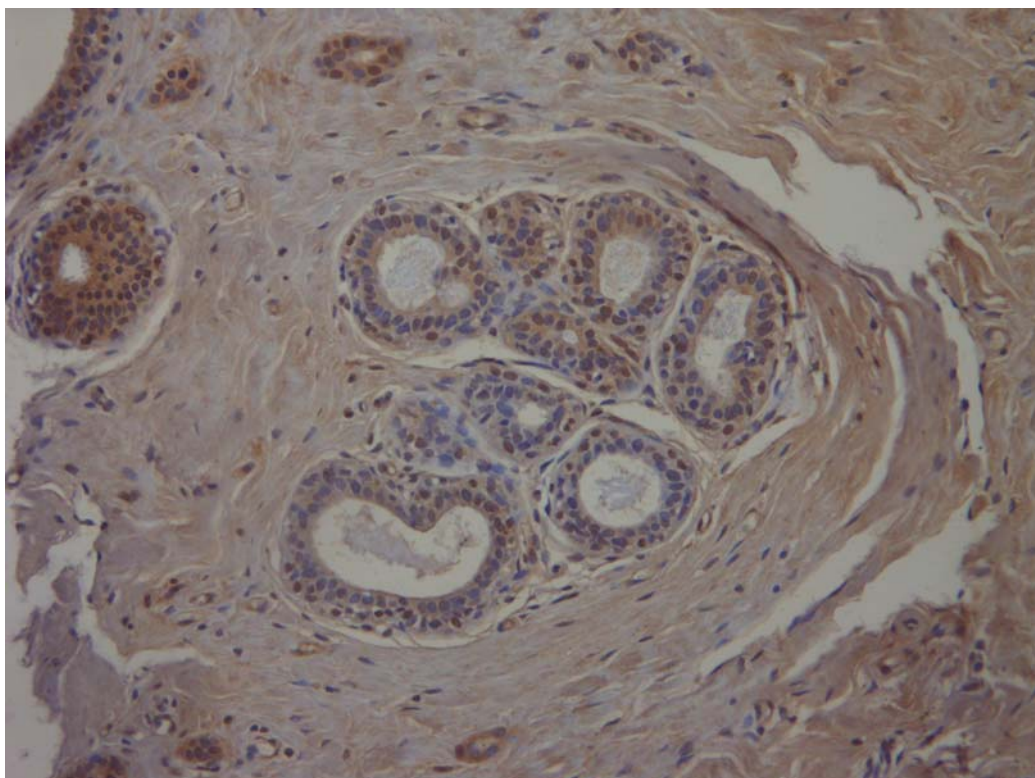
Ο συνδυασμός του προτύπου μεθυλίωσης δύο οποιωνδήποτε γονιδίων της τριάδας RAR-β, cyclin D2 και Twist οδήγησε στην ανίχνευση μετάστασης στο λεμφαδένα με ευαισθησία 93,8% (15/16). Ωστόσο, εξαιτίας των υψηλών ποσοστών μεθυλίωσης στους αρνητικούς λεμφαδένες, η ειδικότητα και η AUC ήταν χαμηλές: 18,5% και 0,561 για τον συνδυασμό RAR-β / cyclin D2, 11,1% και 0,520 για το RAR-β / Twist και 7,4% και 0,500 για το cyclin D2 / Twist.

ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΕΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ

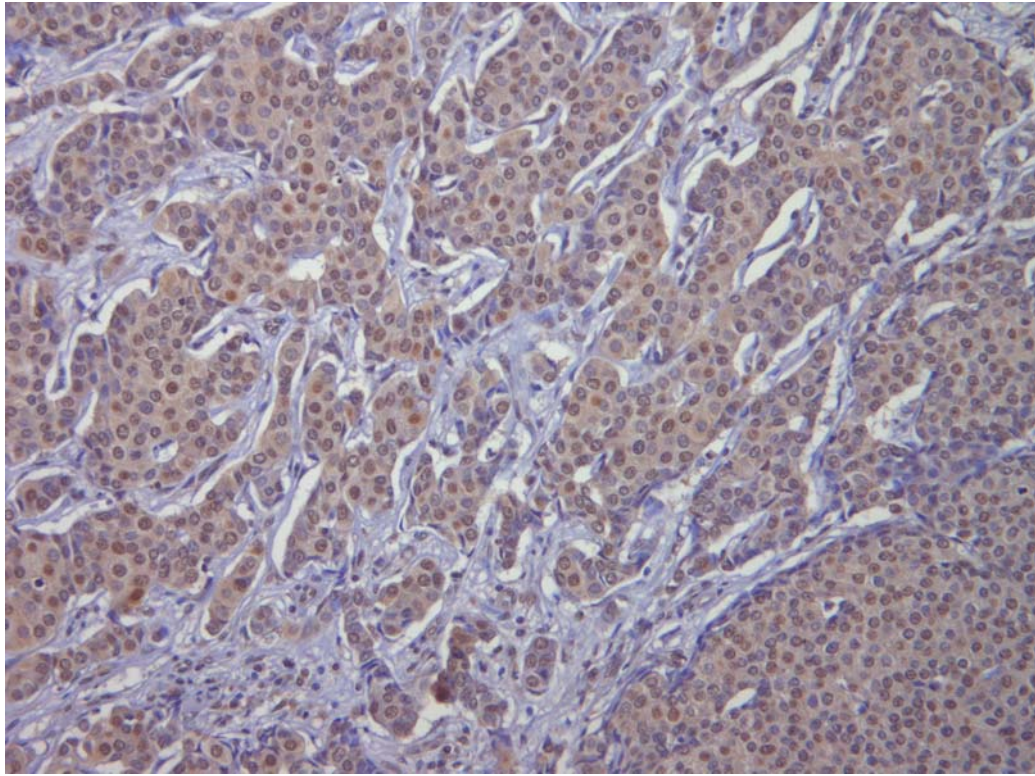
Εικόνα 1. Απουσία έκφρασης του γονιδίου CXCR4 σε δείγμα από αδένωμα (X 100).



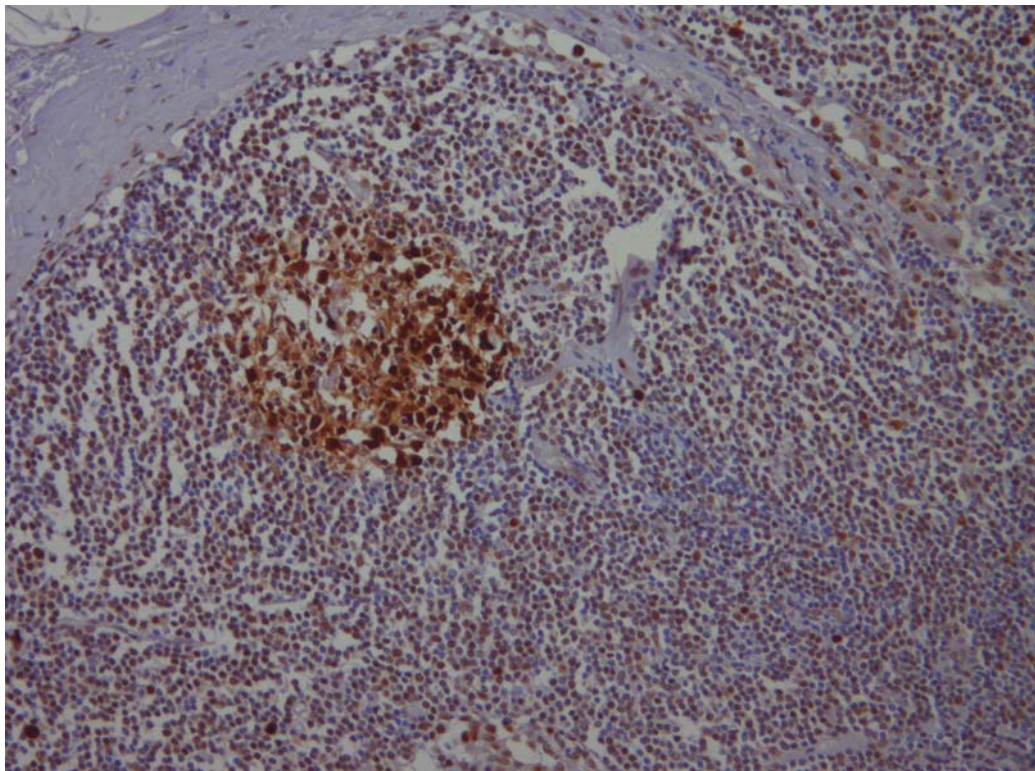
Εικόνα 2. Έκφραση του γονιδίου CXCR4 σε δείγμα από καρκίνο του μαστού (X200).



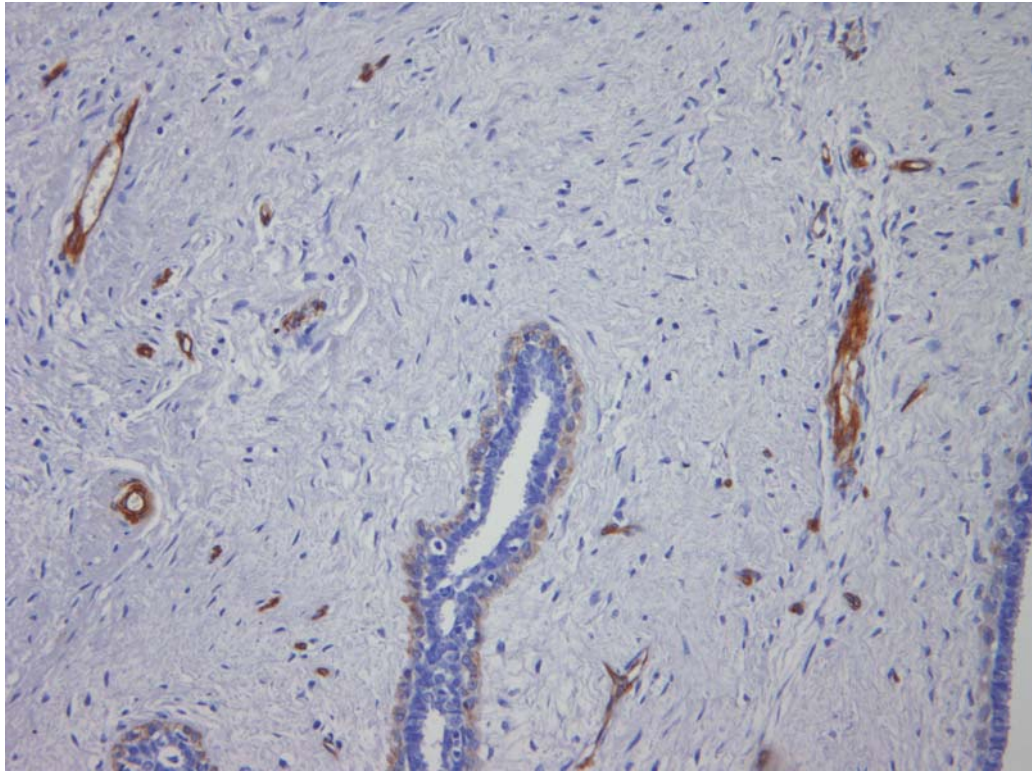
Εικόνα 3. Έκφραση του γονιδίου CXCR4 σε δείγμα από θετικό λεμφαδένα (X 200).



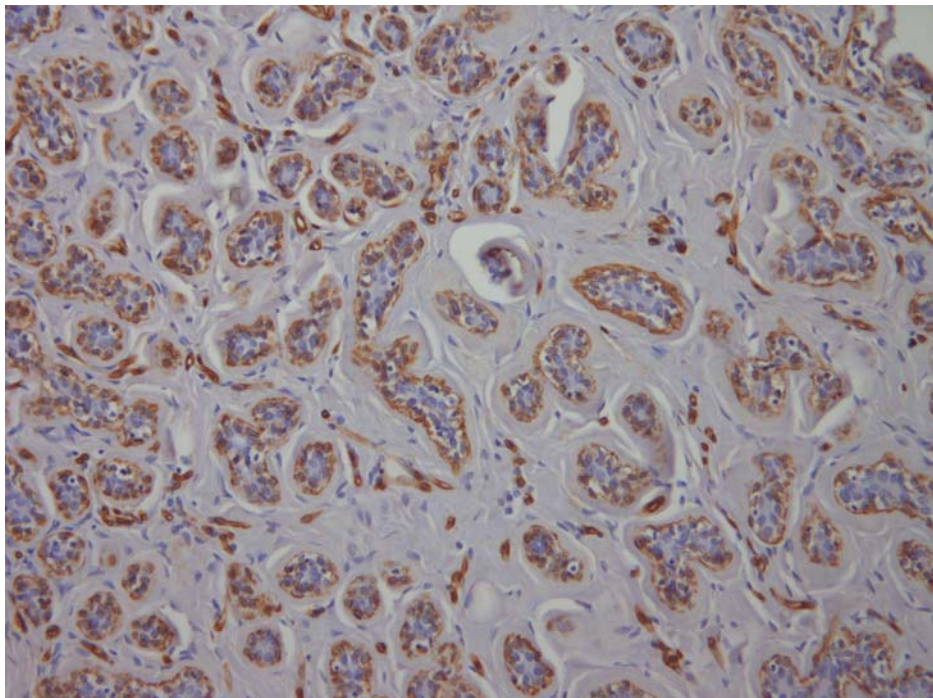
Εικόνα 4. Έκφραση του γονιδίου CXCR4 σε δείγμα από αρνητικό λεμφαδένα (X200)



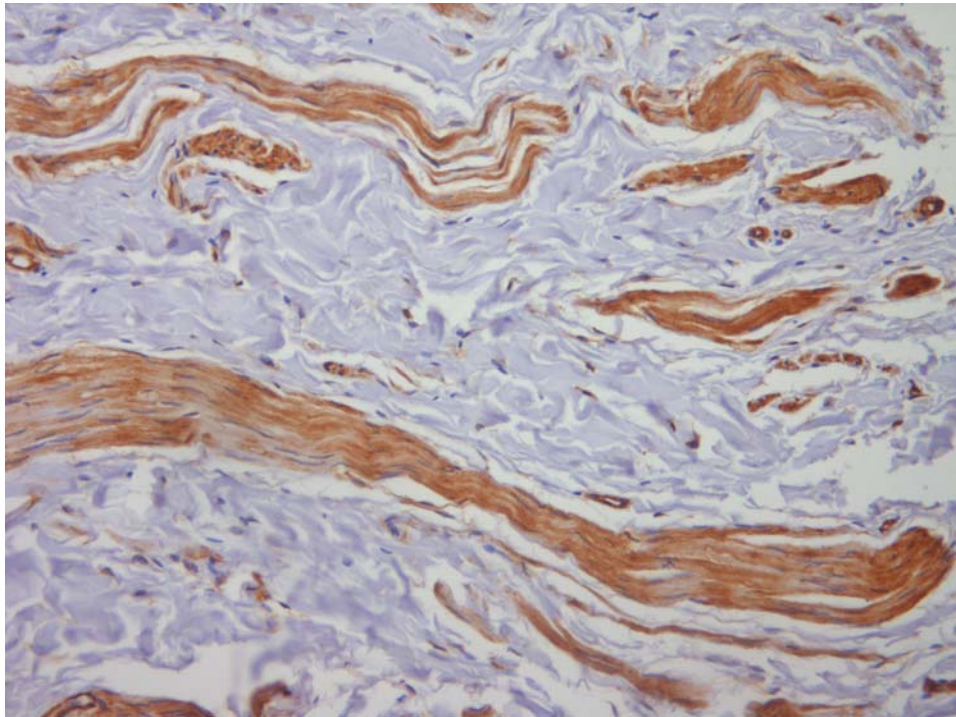
Εικόνα 5. Απουσία έκφρασης του γονιδίου Caveolin-1 σε αδένωμα μαστού (X100).



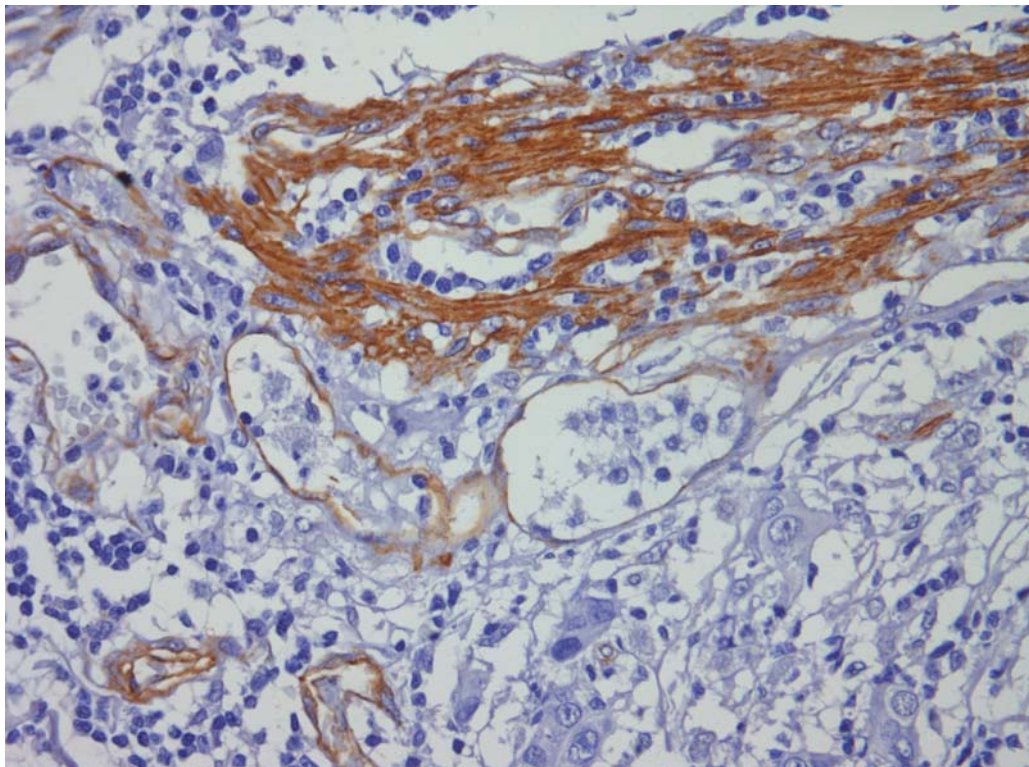
Εικόνα 6. Έκφραση του γονιδίου Caveolin-1 σε καρκινικά κύτταρα του όγκου (X200).



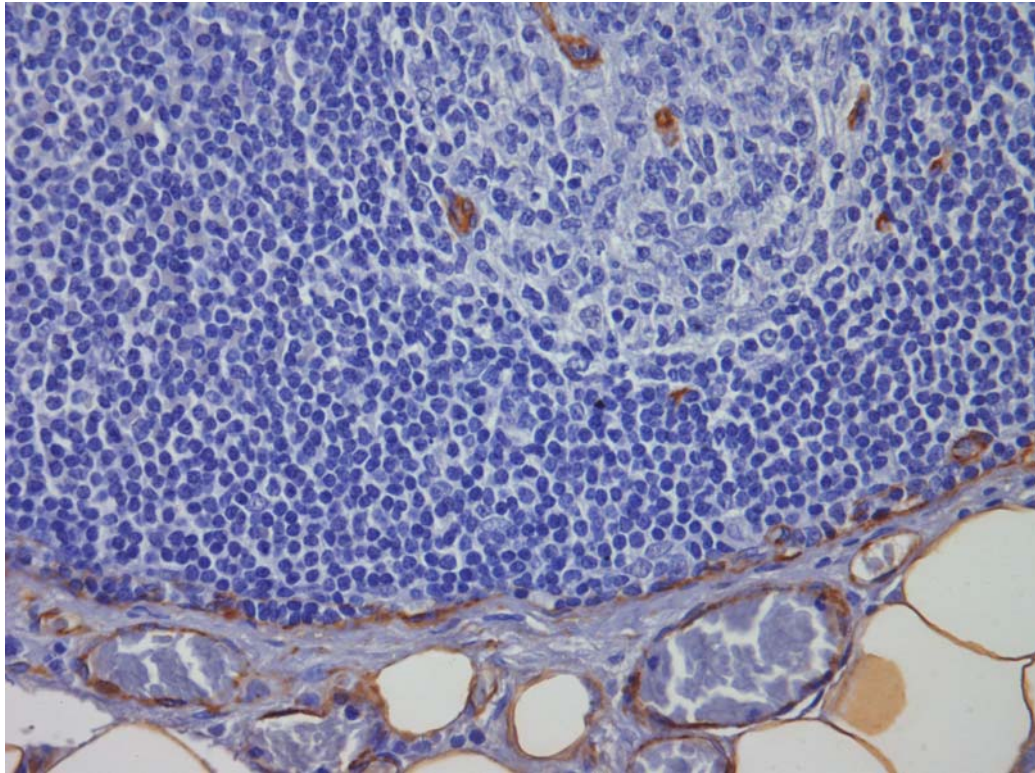
Εικόνα 7. Έκφραση του γονιδίου Caveolin-1 σε στρωματικά κύτταρα του όγκου (X200).



Εικόνα 8. Έκφραση του γονιδίου Caveolin-1 σε θετικό λεμφαδένα (X200).



Εικόνα 9. Έκφραση του γονιδίου Caveolin-1 σε αρνητικό λεμφαδένα (X200).



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρόγνωση και η θεραπεία για τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ύπαρξη ή μη λεμφαδενικών μεταστάσεων. Όπως η καρκινογένεση, έτσι και η μετάσταση είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία που χαρακτηρίζεται από αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων. Πολλές έρευνες έδειξαν ότι η μεθυλίωση του DNA είναι ένα πρώιμο συμβάν στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού που προωθεί τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, μέσω της ενεργοποίησης ογκογονιδίων και της αναστολής της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η ταυτοποίηση αυτών των γονιδίων σε συνδυασμό με τη πρόσφατη πρόοδο στην μοριακή βιολογία μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων δεικτών που θα μπορούσαν να ανιχνεύσουν με μεγαλύτερη ακρίβεια τη μετάσταση ή να προειδοποιήσουν για τον αυξημένο κίνδυνο υποτροπής του καρκίνου του μαστού σε ορισμένες κατηγορίες ασθενείς³.

Αρκετοί ερευνητές έχουν δείξει ότι οι μέθοδοι της μοριακής βιολογίας είναι πιθανώς ανώτερες από τις καθιερωμένες, όπως η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H&E), η ανοσοϊστοχημεία ή ακόμη και η λήψη πολλαπλών τομών στην ανίχνευση της κακοήθειας^{2,88}. Η χρήση ενός πολυγονιδιακού πάνελ για την ανίχνευση του μεταστατικού καρκίνου του μαστού έχει επίσης προταθεί από διάφορα ερευνητικά κέντρα⁹⁰.

Η MSP είναι μία άκρως ευαίσθητη μέθοδος που μπορεί να ανιχνεύσει 1 αντίγραφο μεθυλιωμένου DNA ανάμεσα σε 1.000 μη μεθυλιωμένα αντίγραφα γονιδιωματικού DNA⁹¹ και έχει αναφερθεί να ανιχνεύει «κρυφές» μικρομεταστάσεις στο 13-43% των επιχώριων λεμφαδένων σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο⁹², καρκίνο του οισοφάγου⁹³, γαστρικό καρκίνωμα⁹⁴ ή καρκίνο του πνεύμονα⁹⁵, αλλά η αξία της για

την ανίχνευση μικρομεταστάσεων στους μασχالياίους λεμφαδένες στον καρκίνο του μαστού δεν έχει εξετασθεί. Για να αξιολογήσουμε τη δυνατότητα μοριακής ανίχνευσης και πρόβλεψης της λεμφαδενικής μετάστασης, χρησιμοποιήσαμε ένα πάνελ πέντε μοριακών δεικτών, οι οποίοι έχει αναφερθεί ότι έχουν υψηλή διαγνωστική ακρίβεια στην ανίχνευση του καρκίνου του μαστού ή σχετίζονται με τη δυνατότητα μετάστασης⁶. Στην ομάδα των ασθενών μας, τα γονίδια RAR-β, Cyclin D2 και Twist βρέθηκαν μεθυλιωμένα στην πλειονότητα των όγκων (90%, 96,7% και 93,3%, αντίστοιχα), αλλά σε κανένα από τα δείγματα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,001$), γεγονός που είναι σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία⁶⁻⁹. Δύο τουλάχιστον από τα παραπάνω γονίδια ήταν μεθυλιωμένα σε όλους τους πρωτοπαθείς όγκους. Συνεπώς, η μεθυλίωση οποιωνδήποτε δύο γονιδίων από αυτή τριάδα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την ανίχνευση του καρκίνου του μαστού με 100% ευαισθησία και ειδικότητα (AUC 1.000). Επιπλέον, ο συνδυασμός του προφίλ μεθυλίωσης οποιωνδήποτε δύο από τα προαναφερθέντα γονίδια οδήγησε στην ανίχνευση της λεμφαδενικής μετάστασης με ευαισθησία 93,8%. Ωστόσο, η υπολογισθείσα ειδικότητα ήταν χαμηλή (7,4% - 18,5% ανάλογα με τον συνδυασμό γονιδίων), εξαιτίας κατά πάσα πιθανότητα των υψηλών επιπέδων μεθυλίωσης στους αρνητικούς λεμφαδένες. Δεδομένου ότι μία τεχνική για να μπορεί να εφαρμοστεί για την εκτίμηση του μεταστατικού στάτους των λεμφαδένων και να ανιχνεύσει την μετάσταση και την μικρομετάσταση θα πρέπει να παρουσιάζει ελάχιστα ψευδώς αρνητικά και ψευδώς θετικά αποτελέσματα², η συγκεκριμένη μέθοδος δεν θεωρείται αρκετά ακριβής για κλινική χρήση. Σε ότι αφορά τα γονίδια CXCR4 και Caveolin-1, τα υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης τους στην ομάδα ελέγχου υποδεικνύουν ότι το προφίλ μεθυλίωσης των γονιδίων αυτών δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ανίχνευσης της κακοήθειας.

Το προφίλ της μεθυλίωσης ήταν διατηρημένο σε εξαιρετικά υψηλά ποσοστά μεταξύ του πρωτογενούς όγκου και του θετικού λεμφαδένα (από 68,8% έως 93,8%), ενώ η συχνότητα των παρομοίων προτύπων μεθυλίωσης μεταξύ όγκου και αρνητικού λεμφαδένα ήταν χαμηλότερη, ωστόσο υπερέβαινε το 48%. Μία πιθανή εξήγηση για τη μη απόλυτη ταύτιση του προφίλ μεθυλίωσης μεταξύ πρωτογενούς όγκου και θετικού λεμφαδένα θα μπορούσε να προκύψει από το ετερογενές μοτίβο μεθυλίωσης των πρωτογενών όγκων και την κλωνική επιλογή της μετάστασης στο λεμφαδένα ⁹⁶. Η ετερογένεια των καρκινικών όγκων ως προς τη μεθυλίωση έχει μελετηθεί στο μελάνωμα από τους Rastetter et al⁹⁷ που λάμβαναν διαφορετικά δείγματα ιστών από έναν όγκο και προσδιόριζαν τη μεθυλίωση των διαφορετικών γονιδίων σε κάθε δείγμα, διαπιστώνοντας ετερογένεια στα πρότυπα μεθυλίωσης στο 70% των περιπτώσεων. Έχει επίσης προταθεί η θεωρία ότι η μεθυλίωση ενός γονιδίου μπορεί να χαθεί κατά τη διάρκεια της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Το γονίδιο της καθεδρίνης E, για παράδειγμα, είναι συχνά μεθυλιωμένο σε πρωτογενείς όγκους, αλλά η έκφρασή του ανακτάται στις απομακρυσμένες μεταστάσεις⁹⁸. Η μεθυλίωση αυτών των γονιδίων σε ιστολογικά αρνητικούς λεμφαδένες αλλά όχι στους μάρτυρες υποδεικνύει πιθανώς την παρουσία μικρομεταστάσεων ή απομονωμένων καρκινικών κυττάρων, μη ανιχνεύσιμων στη καθιερωμένη παθολογοανατομική εξέταση των ιστών στα μεθυλιωμένα δείγματα⁹⁹. Το γεγονός ότι το U/U πρότυπο μεθυλίωσης στον όγκο προδικάζει πάντα το ίδιο μοτίβο μεθυλίωσης στους αντίστοιχους λεμφαδένες ενισχύει περαιτέρω αυτή την υπόθεση.

Το ποσοστό της μεθυλίωσης του γονιδίου CXCR4 που καταγράψαμε στα δείγματα από όγκο ήταν παρόμοιο με εκείνο που αναφέρθηκε από τους Ramos et al¹⁰⁰, οι οποίοι διαπίστωσαν 74% συχνότητα μεθυλίωσης του CXCR4 σε ασθενείς σταδίου I. Παρόμοια συχνότητα μεθυλίωσης των CpG νησιδίων στην περιοχή του προαγωγέα

του CXCR4 έχει αναφερθεί σε κυτταρικές σειρές μελανώματος (72,7%)¹⁰¹. Επιπλέον, μελέτες μεθυλίωσης του DNA σε καρκίνο του παγκρέατος έχουν αναφέρει υπερμεθυλίωση στην περιοχή του υποκινητή του CXCR4 στο 45% των κυτταρικών σειρών και στο 46% των πρωτογενών βλαβών αντίστοιχα, και όπως και στη μελέτη μας η στατιστική ανάλυση δεν αποκάλυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά όπως η ηλικία, το φύλο, κτλ¹⁰². Πλήρης απενεργοποίηση του γονιδίου caveolin-1 μέσω μεθυλίωσης παρουσιάστηκε στο 23,4% των δειγμάτων μας από καρκίνο του μαστού και στο 50% των δειγμάτων μας από αδενώματα. Στο παρελθόν, ανάλογα ποσοστά έχουν αναφερθεί για τη μεθυλίωση του γονιδίου caveolin-1 στον καρκίνο του μαστού, ενώ στον καρκίνο του παχέος εντέρου η αντίστοιχη συχνότητα ήταν 3,8% και 5,9%.^{103, 104}

Κατά τη στατιστική μας ανάλυση, το M/M πρότυπο του γονιδίου CXCR4 συνδέθηκε με αρνητική ανοσοιστοχημική χρώση ($p < 0,001$), γεγονός που υποδηλώνει ότι η μεθυλίωση του CXCR4 θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για τη απώλεια της έκφρασης του σε καρκίνο του μαστού. Επιπλέον το M/M πρότυπο συσχετίστηκε με την απουσία λεμφαδενικής μετάστασης ($p = 0,04$). Οι Ramos et al.¹⁰⁰ έδειξαν μία στατιστική συσχέτιση μεταξύ της λεμφαδενικής διήθησης και του μη μεθυλιωμένου CXCR4 υποδηλώνοντας ότι η απομεθυλίωση ενός ογκογονιδίου, όπως το CXCR4, θα μπορούσε να συνδέεται με διαδικασίες όπως η κυτταρική μετανάστευση και η μετάσταση. Επιπρόσθετα, και οι Kang et al.¹⁰⁵ και Su et al.¹⁰⁶ ανέφεραν τη σχέση μεταξύ της πρωτεϊνικής έκφρασης του CXCR4 και της λεμφαδενικής μετάστασης.

Το μοτίβο M/M του γονιδίου caveolin-1 στον όγκο συσχετίστηκε σημαντικά με αρνητική χρώση και με λεμφαδενική μετάσταση στην ομάδα ασθενών μας ($p < 0,001$ και $p = 0,006$, αντίστοιχα), ενώ το μοτίβο M/U στο θετικό λεμφαδένα συσχετίστηκε με υποτροπή της νόσου ($p = 0.05$). Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή ευαισθησία της

MSP, το μοτίβο M/M φαίνεται να εκφράζει την καθολική μεθυλίωση σε όλα σχεδόν τα κύτταρα του δείγματος, ενώ το μοτίβο M/U απεικονίζει ένα μωσαϊκό μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων κύτταρων για τα παραπάνω γονίδια. Ως εκ τούτου, αυτά τα δύο πρότυπα φαίνεται να αντανακλούν μια διαφορετική βιολογική ή κλινική συμπεριφορά.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του caveolin-1 αξιολογήθηκε επίσης χωριστά σε καρκινικά και στρωματικά κύτταρα του όγκου, καθώς έχει επισημανθεί ότι η πρωτεϊνική έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου στις δύο κατηγορίες κυττάρων μπορεί να επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τη μετάσταση⁸⁸. Αυτή η ετερογένεια εξάλλου της έκφρασης της πρωτεΐνης caveolin-1 μπορεί να αντανακλά ετερογένεια της μεθυλίωσης του όγκου και έτσι να εξηγεί πιθανές διαφορές ανάμεσα στα πρότυπα μεθυλίωσης σε πρωτογενείς όγκους και τις αντίστοιχες λεμφαδενικές τους μεταστάσεις.

Η έλλειψη ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του γονιδίου caveolin-1 στο στρώμα συσχετίστηκε με τη λεμφαδενική μετάσταση, γεγονός που είναι σύμφωνο με προηγούμενες έρευνες¹⁰⁶. Έχει προταθεί ότι η απουσία έκφρασης του caveolin-1 σε στρωματικά κύτταρα καρκίνου του μαστού οδηγεί στη λειτουργική αδρανοποίηση του γονιδίου RB απελευθερώνοντας το παράγοντα E2F και επιτρέπει την ενεργοποίηση του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα (transforming growth factor, TGF). Αυτές οι μεταβολές στη συνέχεια ενεργοποιούν στρωματικούς ινοβλάστες και αυξάνουν τη μεταγραφή των γονιδίων που σχετίζονται με την S-φάση, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων στόχων που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες, και τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), γεγονός που εξηγεί την αυξημένη δυνατότητα μετάστασης^{107,108}. Η απώλεια της έκφρασης του caveolin-1 στους ινοβλάστες του στρώματος προστατεύει τα γειτονικά καρκινικά

κύτταρα μέσω της μειωμένης απόπτωσης και της αυξημένης επαγόμενης μέσω του TP53 γλυκόλυσης, δημιουργώντας "ληθαργικό μικροπεριβάλλον του όγκου", το οποίο μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων και να οδηγήσει σε πρόοδο του καρκίνου ¹⁰⁹. Ο λεπτομερής μηχανισμός με τον οποίο η έκφραση του γονιδίου Caveolin-1 αναστέλλεται στο στρώμα του όγκου, ωστόσο, δεν έχει διερευνηθεί πλήρως ¹¹⁰. Η ισχυρή συσχέτιση της έλλειψης ανοσοιστοχημικής έκφραση με το μοτίβο μεθυλίωσης M/M θα μπορούσε να ενισχύσει τη θεωρία ότι η έκφραση του caveolin-1 αναστέλλεται από ένα μηχανισμό μεθυλίωσης του υποκινητή του.

Η ανοσοιστοχημική έκφραση του γονιδίου caveolin-1 στα καρκινικά κύτταρα του όγκου συσχετίστηκε σημαντικά με αρνητική έκφραση του p53 ($p = 0,04$) και υποτροπή της νόσου ($p = 0,04$). Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με αυτά των Qian et al⁸⁹ οι οποίοι έδειξαν τη στενή σχέση μεταξύ της υψηλής ανοσοιστοχημικής έκφρασης της caveolin-1 στα καρκινικά κύτταρα του όγκου και το βραχύτερο ελεύθερο νόσου διάστημα, και με αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι η έκφραση του caveolin-1 στα καρκινικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού ευνοεί την επιβίωση τους μέσω της αναστολής της ενεργοποίησης του p53 και την προστασία από την αποίκις ¹¹¹. Παρά τις προηγούμενες έρευνες που έχουν υποστηρίξει έναν κατασταλτικό ρόλο για το caveolin-1¹¹² στον καρκίνο του μαστού, έχει αναφερθεί ότι το συγκεκριμένο γονίδιο μπορεί να προσφέρει ένα πλεονέκτημα επιβίωσης στα καρκινικά κύτταρα και επιπλέον ότι ακόμη και μετά την απώλεια της έκφρασης του στα αρχικά στάδια της νόσου, η επανεμφάνιση της σε μεταγενέστερα στάδια του καρκίνου μπορεί να συσχετίζεται με πιο επιθετικούς όγκους. ^{113,114}

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καθορισμός του προφίλ της μεθυλίωσης στο καρκίνο του μαστού ενδεχομένως να μπορέσει να διαγνώσει τη λεμφαδενική μικρομετάσταση και να προβλέψει ποιοι όγκοι θα έχουν πιο επιθετική συμπεριφορά και αυξημένη πιθανότητα υποτροπής της νόσου, επανακαθορίζοντας κατά ένα βαθμό την επικουρική θεραπεία στο καρκίνου του μαστού.

Συνοψίζοντας, στη συγκεκριμένη μελέτη ερευνήσαμε το προφίλ μεθυλίωσης τριών γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και την καρκινογένεση (RAR-β, Cyclin D2 και Twist) και δύο γονιδίων που σχετίζονται με την μετάσταση (CXCR4 και caveolin-1), στον καρκίνο του μαστού και στους θετικούς και αρνητικούς λεμφαδένες.

Καταρχάς διαπιστώσαμε ότι το προφίλ μεθυλίωσης των παραπάνω γονιδίων παραμένει σε μεγάλο βαθμό ίδιο ανάμεσα στον όγκο και τον θετικό λεμφαδένα και σε μικρότερο βαθμό (αλλά μεγαλύτερο του 48%) ανάμεσα στον όγκο και τον αρνητικό λεμφαδένα.

Επιπλέον, συσχετίσαμε την απώλεια της έκφρασης των γονιδίων CXCR4 και caveolin-1 με το μοτίβο μεθυλίωσης M/M, γεγονός που εξηγεί σε μοριακό επίπεδο τον μηχανισμό της σίγασης αυτών των γονιδίων στον καρκίνο του μαστού.

Στη συνέχεια, τα προφίλ μεθυλίωσης των πέντε γονιδίων αξιολογήθηκαν ως μοριακοί δείκτες ανίχνευσης του καρκίνου του μαστού στον όγκο και της μετάστασης του στους λεμφαδένες. Διαπιστώθηκε διαγνωστική ακρίβεια 100% στην ανίχνευση καρκίνου στον μαζικό αδένα όταν οποιοδήποτε δύο από τους τρεις δείκτες RAR-β, Cyclin D2 και Twist χρησιμοποιήθηκαν. Παρά το γεγονός ότι κάθε συνδυασμός δύο γονιδίων από την παραπάνω τριάδα παρουσίασε 93,7% ευαισθησία στην ανίχνευση

κακοήθειας στους λεμφαδένες, το ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων ήταν αρκετά υψηλό και η ειδικότητα ιδιαίτερα χαμηλή. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι συγκεκριμένοι μοριακοί δείκτες θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα πολύ ακριβές εργαλείο στην ανίχνευση του καρκίνου στον μαστό, αλλά η διαγνωστική τους ακρίβεια στην ανίχνευση μεταστάσεων και μικρομεταστάσεων στον λεμφαδένα ελαττώνεται, καθιστώντας την εξέταση αυτή ακατάλληλη για κλινική χρήση.

Επιπρόσθετα, παρατηρήσαμε συσχέτιση των γονιδίων CXCR4 και caveolin-1 με πιο επιθετική βιολογική συμπεριφορά του όγκου και συγκεκριμένα με αυξημένη πιθανότητα λεμφαδενικής μετάστασης και υποτροπής. Αναλυτικότερα, η έλλειψη του μοτίβου M/M για το γονίδιο CXCR4, η ύπαρξη του μοτίβου M/M για το γονίδιο caveolin-1, η και η απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης caveolin-1 στα στρωματικά κύτταρα στον όγκο φαίνεται να συνδέονται και αυξημένη πιθανότητα λεμφαδενικής μετάστασης, ενώ το M/U προφίλ μεθυλίωσης του caveolin-1 στο θετικό λεμφαδένα και η θετική χρώση του caveolin-1 στα καρκινικά κύτταρα του όγκου συσχετίστηκαν με αυξημένο ποσοστό υποτροπής του καρκίνου του μαστού στην επταετία.

Δεδομένου του περιορισμένου αριθμού των ασθενών μας, μελλοντικές προοπτικές μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και πολυετή μετεγχειρητική παρακολούθηση θα ήταν χρήσιμες για να επιβεβαιώσουν τα αρχικά μας συμπεράσματα και να και εξετάσουν περαιτέρω την κλινική εφαρμογή τους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74–108.
2. Baker M, Gillanders WE, Mikhitarian K, Mitas M, Cole DJ. The molecular detection of micrometastatic breast cancer. *Am J Surg*. 2003;186 :351-8.
3. Weigelt B, Peterse JL, vant Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 591–602.
4. Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 5462–5482.
5. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet*. 2010; 70: 27-56.
6. Evron E, Dooley WC, Umbricht CB, Rosenthal D, Sacchi N, Gabrielson E, Soito AB, Hung DT, Ljung B, et al. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. *Lancet* 2001; 357(9265): 1335-1336.
7. Widschwendter M, Berger J, Hermann M, Müller HM, Amberger A, Zeschnigk M, Widschwendter A, Abendstein B, Zeimet AG, et al. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92: 826-832.
8. Evron E, Umbricht CB, Korz D, Raman V, Loeb DM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Marks J, Sukumar S. Loss of cyclin D2 expression in the majority of breast cancers is associated with promoter hypermethylation. *Cancer Res*. 2001; 61: 2782-7.

9. Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L, Doglioni C, Beach DH, Hannon GJ. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev.* 1999; 13: 2207-17.
10. Furusato B, Mohamed A, Uhlén M, Rhim JS. CXCR4 and cancer. *Pathol Int.* 2010; 60 :497-505.
11. Simpkins SA, Hanby AM, Holliday DL, Speirs V. Clinical and functional significance of loss of caveolin-1 expression in breast cancer-associated fibroblasts. *J Pathol.* 2012; 227 :490-8.
12. Skandalakis JE, ed. *Surgical anatomy: The embryologic and anatomic basis of modern surgery*, Athens, Greece: Paschalidis Medical Publications; 2004:789.
13. Dirk J. Iglehart. *Diseases of the Breast*. In: CM T, editor. *Sabiston Textbook of Surgery*. 18th Edition ed: Elsevier Saunders, 2007.
14. Abeloff MD. *Cancer of the breast*. In: Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, eds. *Abeloff's Clinical Oncology*. 4th ed. Philadelphia, Pa.: Churchill Livingstone Elsevier; 2008:1875.
15. Iglehart JD. *Diseases of the breast*. In: Townsend CM Jr, Beauchamp D, Evers E, Mattox K. *Sabiston Textbook of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice*. 18th ed. Philadelphia, Pa.: Saunders Elsevier; 2008.
16. Howard BA. In the beginning: the establishment of the mammary lineage during embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2012; 23 :574-82.
17. *Breast cancer*. Fort Washington, Pa.: National Comprehensive Cancer Network. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/breast.pdf. Accessed April 15, 2011.

18. TNM Classification of Malignant Tumours, 6th Edition L. H. Sobin (Editor),
Ch. Wittekind (Editor)
19. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG et al. AJCC
Cancer Staging Manual, Sixth Edition. New York, NY, Springer-Verlag, 2002
20. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield
MR, Hayes DF, Bast RC Jr; American Society of Clinical Oncology.
American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for
the use of tumor markers in breast cancer. J Clin Oncol. 2007; 25: 5287-312
21. American Cancer Society: Cancer facts and figures 2008. Atlanta: American
Cancer Society; 2008.
22. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca
G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC,
Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC. Race, breast cancer
subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. JAMA 2006, 295:
2492-2502
23. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer:
epidemiology, risk factors, genetics. British Medical Journal 2000; 321:624–
628.
24. Elston CW, Ellis IO. Systemic Pathology: The Breast, 3rd ed. Edinburgh,
Churchill Livingstone, 1998.
25. Rosen PR. Rosen's Breast Pathology, 2nd ed. Philadelphia, Lippincott
Williams & Wilkins, 2001.
26. Hylton N. Magnetic resonance imaging of the breast: Opportunities to
improve breast cancer management. J Clin Oncol 2005; 23:1678-1684.

27. Elmore JG, Armstrong K, Lehman CD, Fletcher SW. Screening for breast cancer. *JAMA* 2005; 293: 1245-1256.
28. Smith BL, Souba WW. In: Wilmore DW, Cheung LY, ed. *Breast Procedures, American College of Surgeons Surgery: Principles and Practice*, New York: WebMD; 2002:606-619
29. Elmore JG, Armstrong K, Lehman CD, Fletcher SW. Screening for breast cancer. *JAMA* 2005; 293: 1245-1256.
30. Meyer JE, Smith DN, Lester SC, Kaelin C, DiPiro PJ, Denison CM, Christian RL, Harvey SC, Selland DL, Durfee SM. Large-core needle biopsy of nonpalpable breast lesions. *JAMA* 1999; 281:1638-1641
31. Fisher B, Jeong JH, Anderson S, Bryant J, Fisher ER, Wolmark N. Twenty-five year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *N Engl J Med* 2002; 347: 567-575.
32. Khatcheressian JL, Wolff AC, Smith TJ, Grunfeld E, Muss HB, Vogel VG. American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management guidelines in the adjuvant setting. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 5091-7.
33. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ; Panel members. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005; 16: 1569-83.
34. Vinh-Hung V, Verschraegen C. For the breast conserving surgery project. Breast conserving surgery with or without radiotherapy: pooled analysis for risks for ipsilateral breast tumor recurrence and mortality. *JNCI* 2004; 96: 115-121.

35. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, Mamounas E, Costantino J, Poller W, Fisher ER, Wickerham DL, Deutsch M, et al. Lumpectomy and radiation therapy for the treatment of intraductal breast cancer: Findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-17. *J Clin Oncol* 1998; 16: 441-452.
36. Buchholz TA. Radiation therapy for early-stage breast cancer after breast-conserving surgery. *N. Engl. J. Med* 2009; 360 : 63–70.
37. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER, Mamounas E, Smith R, Begovic M, Dimitrov NV, et al. Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial. *Lancet* 1999; 353: 1993-2000.
38. Goss PE, Strasser K: Aromatase inhibitors in the treatment and prevention of breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19:881-894.
39. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Tamoxifen for early breast cancer: An overview of the randomised trials. *Lancet* 1998; 351:1451-1467.
40. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: Nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001; 30:96-102.
41. Citron ML, Berry DA, Cirincione C, Hudis C, Winer EP, Gradishar WJ, Davidson NE, Martino S, Livingston R, et al: Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as post-operative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: First report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol* 2003; 21:1431-1439.

42. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:3726-3734.
43. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1673-1684.
44. Rossi A, Gridelli C, Gebbia V, Rosati G, Tortoriello A, Maione P, Borsellino N, Rossi N, Pisano A, et al. Single agent vinorelbine as first-line chemotherapy in elderly patients with advanced breast cancer. *Anticancer Res.* 2003; 23: 1657-64.
45. Miller K, Wang M, Galow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2007; 357: 2666-76.
46. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, Jagiello-Gruszfeld A, Crown J, Chan A, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2006; 355 :2733-43.
47. Weinberg RA. How cancer arises. *Sci Am.* 1996; 275: 62-70.
48. Couch FJ, Weber BL. Breast cancer. In Vogelstein B, Kinzler KW (eds), *The Genetic Basis of Human Cancer.* New York: McGraw Hill, 1998.
49. Dick JE. Breast cancer stem cells revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:3547-9.
50. Debies MT, Welch DR. Genetic basis of human breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2001; 6: 441-51.

51. Founds L. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 1954; 14 :327-39
52. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976; 194: 23-8.
53. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235:177-182.
54. Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science*. 1998; 280: 1036-7.
55. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al: Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000; 406:747-752.
56. Knappskog S, Lønning PE. P53 and its molecular basis to chemoresistance in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2012; 6 Suppl 1:S23-30
57. Mackey JR, Kerbel RS, Gelmon KA, McLeod DM, Chia SK, Rayson D, Verma S, Collins LL, Paterson AH, Robidoux A, Pritchard KI. Controlling angiogenesis in breast cancer: a systematic review of anti-angiogenic trials. *Cancer Treat Rev* 2012; 38 :673-88.
58. Domchek S, Weber BL: Inherited genetic factors and breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, ed. *Diseases of the Breast*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004:276-313.
59. Esteva FJ, Sahin AA, Cristofanilli M, et al: Molecular prognostic factors for breast cancer metastasis and survival. *Semin Radiat Oncol* 12:319, 2002.
60. Dillon DA: Molecular markers in the diagnosis and staging of breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 12:305, 2002.

61. Rogers CE, Loveday RL, Drew PJ, Greenman J. Molecular prognostic indicators in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 28:467, 2002.
62. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Loman N, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003; 72:1117-1130.
63. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* 1994; 343: 692-695.
64. Narod S, Foulkes W. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:665-676.
65. Malone K, Daling J, Doody D, Hsu L, Bernstein L, Coates R, et al. Prevalence and Predictors of BRCA1 and BRCA2 Mutations in a Population-Based Study of Breast Cancer in White and Black American Women Ages 35 to 64 Years. *Cancer Res* 2006; 66: 8297-8308.
66. Fistarol SK, Anliker MD, Itin PH. Cowden disease or multiple hamartoma syndromes: cutaneous clue to internal malignancy. *Eur J Dermatol.* 2002; 12: 411-21
67. Thull DL, Vogel VG. Recognition and management of hereditary breast cancer syndromes. *Oncologist.* 2004; 9: 13-24
68. Blumenthal GM, Dennis PA. PTEN hamartoma tumor syndromes. *Eur J Hum Genet.* 2008; 16: 1289-300.

69. Beckmann MW, Niederacher D, Schnürch HG, Gusterson BA, Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med (Berl)*. 1997; 75: 429-39.
70. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nature Rev. Cancer* 2004; 4: 1–11.
71. Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5237-5242.
72. Antequera F, Bird A. CpG islands. *Exs* 1993; 64:169-185.
73. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321:209-213.
74. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci SA* 1993; 90:11995-11999.
75. Cross SH, Bird AP. CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 309-314.
76. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood* 1999; 93: 4059-4070.
77. Robertson KD. DNA methylation and chromatin: Unravelling the tangled web. *Oncogene* 2002; 21: 5361-5379.
78. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 38:285-303, 2001.
79. Szyf M: Targeting DNA methylation in cancer. *Ageing Res Rev* 2003; 2:299-328,.
80. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21:163-167.

81. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16:168-174.
82. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: Too much, but also too little. *Oncogene* 2002; 21:5400-5413.
83. Maeda K, Kawakami K, Ishida Y, Ishiguro K, Omura K, Watanabe G. Hypermethylation of the CDKN2A gene in colorectal cancer is associated with shorter survival. *Oncol Rep* 2003; 10: 935-938.
84. Yi J, Wang ZW, Cang H, Chen YY, Zhao R, Yu BM, Tang XM. P16 gene methylation in colorectal cancers associated with Duke's staging. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 722-725.
85. Tsou JA, Hagen JA, Carpenter CL, Laird-Offringa IA. DNA methylation analysis: A powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene* 2002; 21: 5450-5461.
86. Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, Ivarsson L, Goebel G, Perkmann E, Marth C, Widschwendter M. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res.* 2003; 63: 7641-5.
87. Groen RS, Oosterhuis AW, Boers JE Pathologic examination of sentinel lymph nodes in breast cancer by a single haematoxylin-eosin slide versus serial sectioning and immunocytokeratin staining: clinical implications. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Sep;105(1):1-5. Epub 2007 Jan 13.
88. Lockett MA, Metcalf JS, Baron PL, O'Brien PH, Elliott BM, Robison JG, Cole DJ. Efficacy of reverse transcriptase-polymerase chain reaction screening for micrometastatic disease in axillary lymph nodes of breast cancer patients. *Am Surg.* 1998 Jun; 64(6):539-43; discussion 543-4.

89. Qian N, Ueno T, Kawaguchi-Sakita N, Kawashima M, Yoshida N, Mikami Y, Wakasa T, Shintaku M, Tsuyuki S, Inamoto T, Toi M. Prognostic significance of tumor/stromal caveolin-1 expression in breast cancer patients. *Cancer Sci.* 2011 Aug;102 (8):1590-6.
90. Gillanders WE, Mikhitarian K, Hebert R, Mauldin PD, Palesch Y, Walters C, Urist MM, Mann GB, Doherty G, Herrmann VM, Hill AD, Eremin O, El-Sheemy M, Orr RK, Valle AA, Henderson MA, Dewitty RL, Sugg SL, Frykberg E, Yeh K, Bell RM, Metcalf JS, Elliott BM, Brothers T, Robison J, Mitas M, Cole DJ. Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes correlates with traditional predictors of prognosis: an interim analysis of a prospective multi-institutional cohort study. *Ann Surg.* 2004 Jun;239(6):828-37; discussion 837-40.
91. Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, Blum MA, Lange J, Lapidus A, Garrett E, Argani P, Sukumar S. Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. *Cancer Res.* 2004; 64: 4442-52.
92. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Hibi K, et al. Molecular detection of neoplastic cells in lymph nodes of metastatic colorectal cancer patients predicts recurrence. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2450-4.
93. Pellisé M, Castells A, Ginès A, et al. Detection of lymph node micrometastases by gene promoter hypermethylation in samples obtained by endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4444-9.

94. Hiraki M, Kitajima Y, Sato S, et al. Aberrant gene methylation in the lymph nodes provides a possible marker for diagnosing micrometastasis in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 1177–86.
95. Harden SV, Tokumaru Y, Westra WH, et al. Gene promotor hypermethylation in tumors and lymph nodes of stage I lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1370–5.
96. Oonk MH, Eijssink JJ, Volders HH, Hollema H, Wisman GB, Schuurin E, van der Zee AG. Identification of inguinofemoral lymph node metastases by methylation markers in vulvar cancer. *Gynecol Oncol*. 2012 May;125(2):352-7.
97. Rastetter M, Schagdarsurengin U, Lahtz C, et al. Frequent intra-tumoural heterogeneity of promotor hypermethylation in malignant melanoma. *Histol Histopathol* 2007;22:1005–15.
98. Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem* 2000;275: 2727–32.
99. Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, et al. DNA methylation markers and early stage recurrence in stage I lung cancer. *NEJM* 2008; 358:1118–28.
100. Ramos EA, Grochoski M, Braun-Prado K, Seniski GG, Cavalli IJ, Ribeiro EM, Camargo AA, Costa FF, Klassen G. Epigenetic changes of CXCR4 and its ligand CXCL12 as prognostic factors for sporadic breast cancer. *PLoS One*.2011; 6: 29461
101. Mori T, Kim J, Yamano T, Takeuchi H, Huang S, Umetani N, Koyanagi K, Hoon DS. Epigenetic up-regulation of C-C chemokine receptor 7 and C-X-C

- chemokine receptor 4 expression in melanoma cells. *Cancer Res* 2005; 65:1800-7.
102. Sato N, Matsubayashi H, Fukushima N, Goggins M (2005) *Cancer Biol Ther* The chemokine receptor CXCR4 is regulated by DNA methylation in pancreatic cancer. 4:70-73.
103. Chen ST, Lin SY, Yeh KT, Kuo SJ, Chan WL, Chu YP, Chang JG. Mutational, epigenetic and expressional analyses of caveolin-1 gene in breast cancers. *Int J Mol Med* 2004; 14:577-582.
104. Lin SY, Yeh KT, Chen WT, Chen HC, Chen ST, Chang JG. Promoter CpG methylation of caveolin-1 in sporadic colorectal cancer. *Anticancer Res* 2004; 24:1645-1650.
105. Kang H, Watkins G, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG (2005) The elevated level of CXCR4 is correlated with nodal metastasis of human breast cancer. *Breast* 14: 360–367.
106. Su YC, Wu MT, Huang CJ, Hou MF, Yang SF, Chai CY. Expression of CXCR4 is associated with axillary lymph node status in patients with early breast cancer. *Breast*. 2006 Aug;15(4):533-9. Epub 2005 Oct 18
107. Witkiewicz AK, Dasgupta A, Sotgia F, Mercier I, Pestell RG, Sabel M, Kleer CG, Brody JR, Lisanti MP. An absence of stromal caveolin-1 expression predicts early tumor recurrence and poor clinical outcome in human breast cancers. *Am J Pathol*. 2009 Jun;174(6):2023-34.
108. Sotgia F, Del Galdo F, Casimiro MC, Bonuccelli G, Mercier I, WhitakerMenezes D, Daumer KM, Zhou J, Wang C, Katiyar S, Xu H, Bosco E, Quong AA, Aronow B, Witkiewicz AK, Minetti C, Frank PG, Jimenez SA, Knudsen ES, Pestell RG, Lisanti MP: Caveolin-1^{-/-} null mammary stromal

- fibroblasts share characteristics with human breast cancer-associated fibroblasts, *Am J Pathol* 2008, 174:746–761
109. Cat B, Stuhlmann D, Steinbrenner H, Alili L, Holtkotter O, Sies H, Brenneisen P. Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci* 2006, 119:2727–2738
 110. Martinez-Outschoorn UE, Trimmer C, Lin Z et al. Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: role of hypoxia, HIF1 induction and NFjB activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle* 2010; 9: 3515–33.
 111. Furuta S, Ghajar CM, Bissell MJ. Caveolin-1: would be Achilles' heel of tumor microenvironment? *Cell Cycle*. 2011 Oct 15;10(20):3431. Epub 2011 Oct 15.
 112. Fiucci G, Ravid D, Reich R, Liscovitch M. Caveolin-1 inhibits anchorage independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 2002; 21: 2365–75.
 113. Quest AF, Gutierrez-Pajares JL, Torres VA. Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signaling and cancer. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 1130–50.
 114. Ravid D, Maor S, Werner H, Liscovitch M. Caveolin-1 inhibits anoikis and promotes survival signaling in cancer cells. *Adv Enzyme Regul* 2006; 46: 163–165.